FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

4

Contribution à la biochimie de la Spermine et de la Spermidine

Données analytiques
et application à la détermination des Cationoïdes
dans les tissus d'animaux normaux
et soumis à des anémies expérimentales

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

le 1966

PAR

Marie GIRAUD-TASSY

née le 18 Juin 1934 à Marseille

Pharmacien

Assistant de Chimie

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

Examinateurs de la thèse :

M. le Professeur J.-C. DUMAZERT — *Président*

MM. les Professeurs S. LISSITZKY, A. VIALA, Ag. C. GHIGLIONE — *Assesseurs*

IMPRIMERIE NOUVELLE
120, Rue Sainte
MARSEILLE

Contribution à la biochimie de la Spermine et de la Spermidine

Données analytiques
et application à la détermination des Cationoïdes
dans les tissus d'animaux normaux
et soumis à des anémies expérimentales

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : G. MORIN.
Assesseur : J. LAMY.
Attaché principal, Chef des Services administratifs : P. MOUCHET.

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs honoraires

MM. MONGES, ROCHE, CHAUVIN, MATTEI, DE VERNEJOUL, GIRAUD, MERCIER, MARONNEAUD.

Professeurs titulaires de Chaires

	MM.
Anatomie	GRISOLI
Anatomie appliquée et chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie pathologique	GASTAUT
Bactériologie et virologie	BRAHIC
Biochimie médicale	LISSITZKY
Botanique et cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique et hydrologie	PASTOR
Chimie biologique	DERRIEN
Chimie minérale	MOURGUE
Clinique chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique chirurgicale	LAMY
Clinique chirurgicale	LENA
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	SALMON
Clinique de chirurgie thoracique	DOR
Clinique dermatologique	HADIDA
Clinique d'endocrinologie	VAGUE
Clinique exotique	BLANC
Clinique médicale	N...
Clinique médicale	AUDIER
Clinique médicale thérapeutique et des maladies du sang	OLMER
Clinique des maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique des maladies des voies digestives et de la nutrition	MONGES H.
Clinique médicale infantile	BERNARD R.
Clinique de neurologie	BOUDOURESQUES

Clinique neuro-chirurgicale	PAILLAS
Clinique obstétricale et gynécologique	CHOSSON
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique oto-rhino-laryngologique	APPAIX
Clinique pneumo-phtisiologique	CHARPIN
Clinique psychiatrique	SUTTER
Clinique rhumatologique	RECORDIER
Clinique stomatologique	N...
Clinique urologique	DUCASSOU
Electroradiologie	LEGRE
Histologie et embryologie	PICARD
Histologie et embryologie	STAHL
Hygiène et médecine sociale	SAUTET
Matière médicale	N...
Médecine expérimentale	DONNET
Médecine légale et médecine du travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	GRANJON
Pathologie interne	MOUREN
Pharmacie chimique et toxicologie	N...
Pharmacie galénique	BERNARD P.
Pharmacologie pharmaceutique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires	LAVAL
Physique	DUBOULOZ
Physique médicale	ROUX
Thérapeutique	PIERI
Zoologie et microbiologie	GREBUS

Professeurs titulaires à titre personnel

MM. BOURGEON René	*Chirurgie*
FARNARIER	*Ophtalmologie*
HOUEL	*Chirurgie thoracique et chirurgie du cœur*
IMBERT	*Chirurgie générale*
JAHIER	*Obstétrique et gynécologie*
LAFFARGUE	*Anatomie pathologique*
MERCIER Jacques	*Pharmacodynamie et biologie humaine*
ORSINI	*Pédiatrie*
PAYAN	*Anatomie pathologique*
SERAFINO	*Chirurgie*
TAMALET	*Microbiologie*
TISSIE	*Oto-rhino-laryngologie*
VIALA	*Toxicologie*

Professeurs sans Chaire

MM. DEPIEDS, DESANTI, CRISTAU, GEVAUDAN, CORRIOL.

Maîtres de Conférences - Agrégés

MM. ARDISSON
ARNOUX A.
BARET
BATTESTI
BERNARD P.-M.
BIMAR
BOUYALA
BUISSON
BUREAU
CARCASSONNE M.
CLAUSTRE
CHEVROT
CODACCIONI
COMBALBERT
COURBIER
CREVAT
DALMAS
DELMONT
DOR
DUMON
FRANÇOIS
FOURNIER
GARCIN
GASCARD
GAUTHIER
GAYTE-SORBIER
GIRAUD F.
GHIGLIONE
GRIMAUD
GUERINEL

MM. HUGUET
IMBERT Paul
ISEMEIN
Mme JOUVE
MM. JULLIEN
KAPHAN
LANZA Maurice
LOUCHET
MONGIN
MONTIES
MURATORE
NICOLI
PLASSE
RAYBAUD C.
REYNAUD
RICHAUD
RICHELME
ROLLAND
SALAMON
SARACCO
SEITE
SERMENT
SOULAYROL
SPITALIER
TARANGER
TATOSSIAN
TOGA
VITRY
ZWIRN

Agrégés en exercice

MM. BERARD
BREMOND
BRICOT
CARCASSONNE Y.
CASANOVA
COIGNET
COMITI
GARES
GERARD
JEAN

MM. LACHARD
MICHOTEY
MONGES André
REBOUD
RUF
SARLES
SIMONIN
TEMIME
TRIFAUD

Agrégés libres

MM. BERTHIER
BOURRET
CHAUVIN
DEVIN
FIGARELLA

MM. GAMBARELLI
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0037

A MES PARENTS

A MON MARI ET A MON FILS ERIC

En témoignage de mon amour.

A MES BEAUX-PARENTS

A MA FAMILLE

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur J.-C. DUMAZERT

Il nous a fait le grand honneur de nous accueillir dans son Laboratoire et de présider notre jury de Thèse. Nous le remercions pour la formation scientifique qu'il nous a donnée.

Qu'il trouve dans ce modeste travail l'expression de toute notre gratitude et de notre profond attachement.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur S. LISSITZKY

Qui nous a fait l'honneur de consacrer un peu de son temps si précieux à juger notre travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos remerciements respectueux.

Monsieur le Professeur A. VIALA

Qui nous a accueillie avec tant de bienveillance. Nous le remercions d'avoir aussi aimablement accepté de faire partie de notre jury de Thèse.

Monsieur le Professeur Agrégé C. GHIGLIONE

Qui n'a ménagé ni son temps ni sa peine pour nous aider à mener à bien ce travail. Ses précieux conseils et sa patience inépuisable ont grandement facilité notre tâche.

Puissent ces quelques mots lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre sincère amitié.

A Madame PUGNET

Sa gentillesse et sa bonne humeur nous ont aidée à surmonter bien des difficultés.

Qu'elle trouve ici nos remerciements les plus sincères et le témoignage de notre amitié.

A TOUS MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE

En particulier Madame LE BOURHIS et Monsieur MARCHETTI.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 19

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE 21

I. — STRUCTURE ET CARACTERES CHIMIQUES DE LA SPERMINE, DE LA SPERMIDINE ET DE LEURS SELS 23

A. — La spermine et ses sels 23
B. — La spermidine et ses sels 26

II. — PROCEDES D'EXTRACTION ET CHIMIE ANALYTIQUE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE 28

A. — Isolement de la spermine et de la spermidine à partir des milieux biologiques 28

B. — Séparation des polyamines 29

C. — Techniques colorimétriques de dosage de la spermine et de la spermidine 31
a - formation de complexes colorés avec l'ion cuivre 31
b - réaction colorée avec la ninhydrine 31
c - réaction avec la paranitraniline diazotée 33
d - dosage par l'intermédiaire des dérivés dinitrophénylés 33

D. — Caractérisation de la spermine et de la spermidine 35

III. — BIOCHIMIE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE 37

A. — Biosynthèse 37

a - Biosynthèse de la spermidine 37
1. Chez les micro-organismes 37
2. Chez les animaux supérieurs 38
b - Biosynthèse de la spermine 39

B. — Métabolisme 39

a - Oxydation enzymatique 39
1. Chez les bactéries 39
2. Chez les animaux supérieurs 40
3. Chez les végétaux 40
4. Mécanisme de l'oxydation 40

b - Réactions de transfert des radicaux 41
1. Transglutamination 41
2. Transamidination 41

c - Activation des systèmes enzymatiques 41

C. — Répartition des polyamines 42

a - Chez les virus 42
b - Chez les micro-organismes 42
c - Chez les animaux supérieurs 43
d - Chez les animaux inférieurs 44
e - Chez les végétaux 44

Pages

D. — Activité biologique de la spermine et de la spermidine 45
a - Action des polyamines sur la stabilité des membranes cellulaires 45
b - Combinaison des polyamines et des acides nucléiques 46
c - Action des polyamines sur la prolifération cellulaire et la germination 47
d - Action antagoniste des antimicrobiens et activité antibactérienne de la spermine et de la spermidine 48

IV. — PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE 50

V. — LES ANEMIES EXPERIMENTALES ET LES POLYAMINES 51

OBJET DU TRAVAIL 53

RECHERCHES PERSONNELLES 55

PREMIERE PARTIE

CHIMIE ANALYTIQUE DE LA SPERMINE, DE LA SPERMIDINE ET DE DIVERS CATIONOIDES 55

CHAPITRE PREMIER : DOSAGE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE PAR PRECIPITATION SOUS FORME DE PERIODURE 57

I. — Technique général de précipitation et de dosage de la spermine et de la spermidne sous forme de periodure 57

II. — Détermination des coefficients d'analyse 58

III. — Vérification de la valeur des coefficients d'analyse 60

IV. — Influence de la concentration en sels des solutions sur la précipitation des polyamines sous forme de periodure 61

CHAPITRE DEUXIÈME : PROCEDE D'EXTRACTION DES BASES AMINEES DE SOLUTIONS DILUEES PAR LA METHODE DITE DE « DOUBLE ECHANGE SIMULTANE » 63

I. — Théorie du fonctionnement des échangeurs d'ions 63

II. — Technique d'absorption par « double échange simultané » 66

III. — Application de la technique d'absorpton par double échange simultané à la récupération de composés biologiques de caractère basique en solutions diluées 67
A. — Spermine et spermidine 67
B. — Choline 68
C. — Arginine, histidine et lysine 69

IV. — Récupération des composés organiques basiques fixés sur les résines au cours de l'absorption par double échange simultané 70
A. — Récupération de la choline, de la spermidine et de la spermine fixées sur la résine cationique 70
B. — Répartition des amino-acides bibasiques sur la résine anionique et cationique au cours de l'absorption par double échange simultané 71

CHAPITRE TROISIÈME : CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEUR D'IONS (Dowex) DE LA SPERMINE, DE LA SPERMIDINE ET DE DIVERS CATIONOIDES 73

I. — Chromatographie sur colonne 73

Pages

II. — Analyse de l'effluent 75
A. — Recherche et identification des composés organiques basiques par ionophorèse 76
a - conditions opératoires 76
b - réactions co'orées d'identification 76
1. révélation par le réactif de DRAGENDORF 77
2. révélation par le réactif à la ninhydrine 77
B. — Recherche des composés ninhydrine positifs et dosage de la cadavérine et de la putrescine dans l'effluent des séparations chromatographiques 77
C. — Dosage de la spermine, de la spermidine et de la choline 78

III. — Résultats 79

DEUXIEME PARTIE

DOSAGE DES CATIONOIDES DANS LES TISSUS D'ANIMAUX NORMAUX ET INANITIES 81

CHAPITRE PREMIER : TENEUR EN CATIONOIDES DES TISSUS D'ANIMAUX NORMAUX 83

I. — Déprotéinisation des homogénats tissulaires 83

II. — Absorption des cationoïdes par double échange simultané 83

III. — Hydrolyse 84

IV. — Séparation chromatographique des cationoïdes et ana'yse des effluents 85

CHAPITRE DEUXIÈME : VARIATION DE LA TENEUR EN DIFFERENTS CATIONOIDES DES TISSUS DE RATS SOUMIS A L'INANITION PROTEIQUE 89

CHAPITRE TROIS-ÈME : VARIATION DE LA TENEUR EN DIFFERENTS CATIONOIDES DE TISSUS D'ANIMAUX (RAT et LAPIN) SOUMIS A L'INTOXICATION PAR LA PHENYLHYDRAZINE 95

I. — Expérimentation chez le rat 95

II. — Expérimentation chez le lapin 97

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 99

BIBLIOGRAPHIE 103

INTRODUCTION

On range dans le groupe des amines biologiques *des principes immédiats azotés contenus dans les cellules animales, végétales et bactériennes qui interviennent dans divers processus de catabolisme et d'anabolisme et qui présentent pour certains d'entre eux des activités hormonales et vitaminiques notables.*

*C'est à GUGGENHEIM (73) que l'on doit la terminologie d'*amines biologiques *ou* amines d'origine biologique. *Il note à ce sujet « ... que cette dénomination peut paraître imprécise : si nous l'avons adoptée c'est uniquement parce que nous n'avons pas réussi à trouver une expression qui satisfasse à la fois aux considérations d'ordre chimique et physiologique »... « Tous ces composés ont une propriété commune qui est leur caractère basique plus ou moins accentué, dû à la présence dans leur molécule d'une ou de plusieurs fonctions amines, présence qui leur confère des propriétés physico-chimiques très voisines, telles leur solubilité et leur mode de réaction aux agents précipitants. Cela justifie à notre avis le groupement de ces substances en vue de leur description détaillée et de leur classification »...* (Loc. cit.)

L'importance biologique des amines est très variable. Des éléments doués d'activité importante, nécessaires au cycle vital, se rencontrent à côté de produits ultimes des métabolismes ; certains présentent une très grande réactivité alors que d'autres semblent indifférents aux conditions biologiques. Par ailleurs si des amines provoquent, en milieu dilué, des réactions physiologiques remarquables, il n'en est pas de même pour d'autres dont les effets "in vivo" sont à peine perceptibles.

Ainsi la classification de ces bases fondée sur la structure chimique paraît reposer sur le principe général le plus valable. Les amines biologiques se différencient selon quatre critères :

- *la nature du squelette hydrocarboné : aliphatique saturé ou éthylénique, cyclique et hétérocyclique,*
- *le nombre des fonctions amines (composé mono ou polyaminé),*
- *la classe de ou des fonctions amines impliquées dans la structure (amines primaires, secondaires, tertiaires, ammonium quaternaire ou oxyde d'amine),*
- *la présence d'autres groupements fonctionnels accompagnant le groupement amine : alcool, acide, ester.*

On exclut systématiquement du groupe des amines biologiques diverses familles importantes de la Biochimie, telles que les amino-acides, l'arginine et les composés guanidylés apparentés, l'urée et les dérivés biologiques de l'acide carbamique.

Il faut cependant noter que les amines biologiques dérivent directement ou indirectement des amino-acides selon divers processus principaux qui sont :

— *l'alcoylation à l'azote,*

— *la décarboxylation,*

— *la cyclisation,*

— *la décarboxylation associée à une copulation.*

Nous nous sommes intéressée au cours de ce travail, essentiellement aux polyamines aliphatiques et en particulier à la spermine *et à la* spermidine. *Ces deux polyamines, par leur répartition quasi générale dans les tissus animaux, leur concentration élevée dans certains liquides biologiques et en particulier le sperme, ont été l'objet de nombreuses recherches. Celles-ci ont été orientées dans le but d'établir les voies de leur biosynthèse, d'approfondir les mécanismes biologiques dans lesquels elles sont impliquées et de déterminer leur activité physiologique.*

Si les progrès enregistrés ces dernières années dans les connaissances générales sur ces deux composés sont particulièrement notables, il n'en demeure pas moins que de nombreux problèmes les concernant doivent encore être éclaircis. Aussi avant de relater nos recherches, nous nous sommes proposée d'exposer les principales données acquises actuellement au sujet de la chimie et de la biologie de la spermine et de la spermidine.

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

Dans la famille complexe des amines biologiques, la spermine et la spermidine sont les substances les plus anciennement connues. La toute première publication relative à la spermine est très probablement la lettre de LEWENHOECK à la « British Society » en 1677 dans laquelle il décrit les spermatozoïdes. Il rapporte dans le sperme la présence d'un composé... « et cum praedicta paucillum temporis steterat in ea deservabantur trilaterales figurae ab utraque parte in aculeum desinentes ; quibusdam longitudino minutissimae arenae, aliquae aliquantulum majores, ut fig. A. Praeterea, adeo nitidae ac pellucidae, ac si crystallinae fuissent » (*). Ces cristaux étaient vraisemblablement du phosphate de spermine (152).

Par la suite des cristaux semblables ont été décrits par VAUQUELIN (194), BOETTCHER (22), CHARCOT et ROBIN (30), SCHREINER (166) et de nombreux autres chercheurs. Ils ont été également obtenus à partir de différents extraits tissulaires, en particulier lorsque les tissus ont été conservés un certain temps avant d'être traités. De nombreuses suppositions, fausses d'ailleurs, concernant la nature chimique de ces cristaux, furent avancées et plusieurs dénominations leur furent attribuées (cristaux de BOETTCHER, de CHARCOT-LEYDEN, de CHARCOT-ROBIN, etc.). Le nom de spermine ne fut adopté qu'en 1888 (107).

SCHREINER (166), le premier, les a identifiés correctement comme constitués du phosphate d'une base organique. Des observations cristallographiques ont montré que les cristaux isolés du sperme étaient identiques à ceux provenant d'autres tissus. Au cours des quarante années qui suivirent, ces observations furent répétées par de nombreux auteurs. POEHL confirme l'isolement du phosphate de spermine, mais publie un certain nombre de notes discutant sa valeur thérapeutique. En réalité, cet ensemble de recherches aboutit à la commercialisation d'un produit de composition douteuse et sans valeur clinique. Au cours de cette période, plusieurs

(*) Observation de M. Anthoni LOWENHOECK au sujet d'animalcules présents dans le sperme :

« ... et lorsque cette substance a été un peu étudiée on a pu distinguer des figures à trois faces, se terminant en pointe à chaque extrémité. Les unes étaient de la longueur du plus petit grain de sable, les autres étaient un peu plus grosses, comme sur la figure A. Elles étaient d'autre part aussi brillantes et claires que si elles avaient été des cristaux... »

autres chercheurs isolèrent des composés basiques de plusieurs tissus. Ils reçurent le nom de musculamine, neuridine et gérontine. Des études ultérieures (46) démontrèrent qu'ils étaient identiques à la spermine.

Dans une série de remarquables travaux, publiés de 1923 à 1927, Dudley, Rosenheim et Rosenheim (45, 48, 151, 152) et Wrede et coll. (198, 199) établirent la présence de la spermine dans de nombreux tissus de mammifères, déterminèrent la structure chimique correcte de la base et confirmèrent cette dernière par synthèse. Peu après (49) la spermidine fut isolée du pancréas de bœuf, sa structure établie et sa synthèse proposée.

I. - STRUCTURE ET CARACTÈRES CHIMIQUES DE LA SPERMINE, DE LA SPERMIDINE ET DE LEURS SELS

A. — LA SPERMINE

La spermine (N, N' bis (3 aminopropyl) 1,4 diaminobutane) : ($C_{10}H_{26}N_4$) (P.M. = 202), répond à la formule suivante :

$$H_2N - (CH_2)_3 - NH - (CH_2)_4 - NH - (CH_2)_3 - NH_2$$

Les premiers procédés proposés pour sa synthèse sont longs et délicats. Ils ne conduisent qu'à des rendements faibles.

Récemment Schultz (168), Kormendy et Horvath (103) ont obtenu la spermine par d'autres voies, selon un synthèse comportant les étapes suivantes :

1° L'obtention du 1,4 diaminobutane réalisée par action du nitrite de sodium en présence d'acide chlorhydrique sur une solution éthérée du dérivé di-hydrazinique de l'acide adipique selon la réaction :

$$\begin{array}{l} CH_2CH_2CONHNH_2 \\ | \\ CH_2CH_2CONHNH_2 \end{array} + NO_2H \rightarrow \begin{array}{l} CH_2CH_2NH_2 \\ | \\ CH_2CH_2NH_2 \end{array}$$

Le rendement de cette opération est de 70 à 75 %.

2° La cyanoéthylation du 1,4 diaminobutane par l'acrylonitrile conduit au N, N' bis (2-cyanoéthyl)-diaminobutane :

$$H_2N{-}(CH_2)_4{-}NH_2 + 2\,CH_2{=}CH{-}CN \rightarrow \begin{array}{l} CH_2CH_2NH{-}(CH_2)_2{-}CN \\ | \\ CH_2CH_2NH{-}(CH_2)_2{-}CN \end{array}$$

3° La réduction de ce dernier composé en spermine par la technique de Terent'ev et coll. (190) consiste à provoquer la formation d'hydrogène naissant dans le milieu par action du sodium sur le butanol.

Cette technique, relativement rapide, conduit à de très bons rendements. Signalons que, selon un protocole identique dans son principe, Terent'ev et coll. (190) ont obtenu divers homologues de la spermine et en particulier la N, N'-bis (3-aminopropyl)-éthylène diamine.

La spermine base se prépare à partir de la solution aqueuse de son chlorhydrate ou d'une suspension de son phosphate par addition à l'une ou

à l'autre d'une solution à 50 p. 100 de carbonate de potassium. La base libérée est extraite par le chloroforme. L'évaporation du solvant conduit à un sirop qui se solidifie au bout de quelque temps. La spermine se présente sous forme d'aiguilles fondant à 55°-60°. Elle présente un point d'ébullition de 150° sous 5 mm de mercure. Très hygroscopique, elle est soluble dans l'eau et dans les alcools (éthanol, butanol). Elle est insoluble dans l'éther, le benzène et l'éther de pétrole. Abandonnée à l'air elle se transforme rapidement en carbonate en se liquéfiant.

La spermine est stable vis-à-vis des bases minérales fortes en solutions concentrées et de l'acide chlorhydrique à 30 p. 100. En solution très alcaline elle est entraînable par la vapeur d'eau.

La perméthylation de la spermine conduit à la décaméthylspermine. L'étude de ce dérivé a permis à Dudley et Rosenheim (46) d'établir que deux atomes d'azote sont impliqués dans des groupements amines primaires, alors que les deux autres entrent dans la structure des deux fonctions amines secondaires. Parmi les principaux dérivés de la spermine, signalons également la tétrabenzoylspermine (p.f. = 155°) (46). Ce composé cristallise en fines aiguilles qui s'agglomèrent en flocons à partir de solutions dans divers mélanges binaires (acétone : éther de pétrole ; acétone : eau ; alcool : eau). C'est à partir des déterminations effectuées sur ce dérivé que Dudley et Rosenheim (46) ont déterminé le poids moléculaire de la base.

Les principaux sels de spermine sont :

— *le tétrachlorhydrate* qui cristallise en petites paillettes. Très soluble dans l'eau, le chlorhydrate de spermine fond à 250° et brunit entre 300° et 302°. Il se liquéfie avec formation d'un dégagement gazeux à 310°.

— *le phosphate* de spermine ($C_{10}H_{24}N_4$, 2 PO_4H_3, 6 H_2O) se présente sous forme de cristaux caractéristiques en forme de navette (fig. n° 1).

Figure n° 1. — *Microphotographie de cristaux de phosphate de spermine* (x. 400) (C. Dumazert et C. Ghiglione).

Insoluble dans l'éthanol, l'éther et les solvants organiques, il est facilement soluble dans les acides et les bases diluées. Il est peu soluble dans l'eau : 1 p. 100 dans l'eau bouillante et seulement 0,037 p. 100 dans l'eau à 20°.

— *le picrate* de spermine (décomposition à 248°-250°) cristallise de ses solutions aqueuses en longues aiguilles qui peuvent atteindre 2 cm.

— le *picrolonate* (p.f. = 288°) s'isole sous forme d'aiguilles prismatiques jaune pâle.

— le *chloroaurate* (p.f. = 225°) précipite sous forme de petites paillettes jaune d'or.

— le *chloroplatinate* (p.f. = 225°) se présente sous forme de cristaux tabulaires rhomboédriques.

Ces derniers sels sont insolubles dans l'eau ; leur formation a rendu d'importants services en Chimie Analytique.

B. — LA SPERMIDINE

La spermidine (N (3 aminopropyl) 1,4 diaminobutane) $C_7H_{19}N_3$) (P.M. = 193) répond à la formule :

$$H_2N — (CH_2)_3 — NH — (CH_2)_4 — NH_2$$

Elle a été isolée des eaux-mères de cristallisation du phosphate de spermine à partir d'extrait cellulaire de pancréas de bœuf. La spermidine en tant que base libre présente les mêmes propriétés que la spermine.

Synthétisée tout d'abord par Dudley, Rosenheim et Starling (47), puis plus récemment par Danzig et Schultz (39), elle est préparée selon ces derniers auteurs par une technique que l'on peut schématiser de la manière suivante :

— dans une première étape on obtient le γ-aminobutyronitrile par action de l'ammoniaque concentrée sur le γ-bromobutyronitrile à température ordinaire en laissant en contact ces deux composés pendant 48 heures :

$$NH_3 + Br — (CH_2)_3 — CN \rightarrow HBr + H_2N — (CH_2)_3 — CN$$

— la cyanoéthylation de cette substance conduit au N(2-cyanoéthyl) γ-aminobutyronitrile :

$$NC — (CH_2)_3 — NH — (CH_2)_4 — CN$$

Cette réaction se fait en milieu éthéré, à la température de 30° environ, pendant 14 heures. On isole le dinitrile sous forme de son chlorure.

— On procède enfin à la réduction catalytique des fonctions nitriles par l'hydrogène en présence d'oxyde de platine sous 4 atmosphères.

Jakson (93) a apporté une modification intéressante à cette synthèse conduisant à un rendement sensiblement supérieur. Il propose en effet l'obtention d'un dérivé intermédiaire le N(2-cyanoéthyl)N'-acétyl-1,4 diaminobutane qui est réduit en monoacétylspermidine. Ce dernier, hydrolysé en milieu chlorhydrique, libère la spermidine. La monoacétylspermidine est constituée de deux isomères qui se différencient par la position du radical acétyle sur l'un ou sur l'autre groupement aminé primaire.

Spermidine et spermine ont été également préparées sous forme de ^{14}C-spermidine et de ^{14}C-spermine. Ces molécules marquées ont été obtenues soit en utilisant le ^{14}C-acrylonitrile et les bases obtenues portent l'atome traceur sur le chaînon propylamino, ou bien en mettant en œuvre le ^{14}C-aminobutane ; dans ce cas la spermidine et la spermine possèdent l'atome radioactif dans le reste diaminobutyl. Signalons enfin que la ^{14}C-spermidine et la ^{14}C-spermine peuvent être obtenues par biosynthèse.

Les principaux sels de spermidine sont :

— le *chlorhydrate* qui se présente en cristaux tabulaires minces.

— le *phosphate* $(C_7H_{19}N_3)^2$, 3 PO_4H_3) (P.F. = 207°) cristallise en paillettes brillantes. Il est beaucoup plus soluble dans l'eau que le phosphate de spermine et cette différence de solubilité est mise à profit pour la séparation des deux polyamines.

— le *picrate* de spermidine (p.f. = 210°-212°) se présente sous forme d'aiguilles jaune citron qui se réunissent parfois en agrégats de forme tabulaire.

— le *chloroaurate* (p.f. = 220°-222°) précipite en petites paillettes jaune d'or, minces et brillantes.

II. - PROCÉDÉS D'EXTRACTION ET CHIMIE ANALYTIQUE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE

L'étude de la teneur en spermine et en spermidine des produits biologiques est rendue difficile par le manque de spécificité des techniques permettant l'identification et le dosage de ces polyamines. En effet, comme nous venons de le voir, ces bases ne présentent pas de caractéristiques permettant de conduire à une ou à des réactions spécifiques. Ceci souligne l'intérêt des techniques d'extraction et de séparation qui constituent les premières étapes de tous procédés analytiques et sur lesquelles reposent en grande partie la validité des déterminations. Il est donc nécessaire de séparer tout d'abord les polyamines des autres matériaux cellulaires, puis sur ce milieu purifié d'isoler l'une de l'autre les polyamines par des moyens convenables, ce n'est qu'alors qu'interviennent les procédés de dosage.

A. — ISOLEMENT DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE A PARTIR DES MILIEUX BIOLOGIQUES

Les premières techniques mises en œuvre utilisaient l'isolement de la spermine et de la spermidine par précipitation des polyamines sous forme de leur phosphate ou de leur picrate relativement peu soubles. Ces procédés étaient longs et conduisaient à des pertes importantes. Par la suite, on précipita la spermine sous forme de flavianate car ce sel présente une moins grande solubilité que les dérivés précédents (68, 75). Les sels de spermidine, plus solubles que ceux de spermine, ne permettent pas une bonne détermination de celle-ci dans les extraits biologiques.

L'entraînement des bases par la vapeur d'eau en milieu alcalin constitue un procédé de purification pour séparer les amines de la partie non volatile des extraits.

L'extraction des amines par les solvants organiques (*n*- ou *t*-butanol) après alcalinisation du milieu par un mélange de sulfate de sodium et de phosphate trisodique est le procédé le plus utilisé. Les amines passent dans la phase butanolique tandis que les amino-acides et les protéines demeurent dans la phase aqueuse. On peut craindre, cependant, au cours de cette extraction, que certains dérivés des polyamines possédant des groupements acides ne passent dans la phase alcoolique et que certains composés fragiles ne soient détruits en milieu alcalin.

B. — SEPARATION DES POLYAMINES

Les techniques modernes ont permis de réaliser d'importants progrès dans le domaine de la séparation des polyamines. La séparation par cristallisation fractionnée des phosphates de spermine et de spermidine ne présentent plus, à l'heure actuelle, qu'un intérêt historique. Les séparations par chromatographie et par ionophorèse sont les méthodes de choix.

En ce qui concerne les techniques chromatographiques, tous les procédés classiques ont été mis en œuvre.

La *chromatographie par échange d'ions* sur résine est la plus utilisée. Les résines de caractère acide (Dowex 50 et Amberlite XE-64) retiennent les polyamines fortement basiques tandis que les autres constituants tissulaires ne sont pas fixés (156, 186). Un choix judicieux des solvants d'élution permet de séparer les polyamines. Différents procédés ont été publiés en détail par de nombreux auteurs (43, 156, 164, 170, 182, 186, 192). Chacun d'entr'eux présente à la fois des avantages et des inconvénients.

La chromatographie sur Dowex 50 (forme H^+), résine sulfonique, utilisant l'acide chlorhydrique comme agent d'élution est particulièrement utilisée avant de procéder aux déterminations nécessitant l'élimination du solvant (mesures de radioactivité, formation des DNP-polyamines... (*). En effet l'acide est suffisamment volatil pour être éliminé des fractions recueillies. L'acide chlorhydrique conduit à mettre les matériaux d'extraction en milieu acide minéral fort et, bien que les polyamines elles-mêmes ne soient pas affectées par ce traitement, leurs dérivés labiles peuvent être hydrolysés. Un autre inconvénient de cette méthode réside dans le fait que par exemple le 1,4 diaminobutane n'est pas correctement séparé de ses homologues, de l'ornithine et de la lysine. Un handicap sérieux de ce procédé réside dans la mauvaise séparation de la S-adénosylméthionine, de la spermine et de la spermidine, séparation indispensable à réaliser pour certaines expériences relatives à la biosynthèse des polyamines. Très souvent, ces inconvénients sont négligeables en raison du but poursuivi. L'emploi de l'Amberlite IRC-50 (XE-64, forme K^+), résine carboxylique, et de l'élution des bases par des solutions de sulfate de sodium à des concentrations variables et tamponnées par du phosphate de sodium permettent de meilleures résolutions. Cependant, les diverses polyamines ne sont pas très bien séparées et les éluats contiennent de fortes proportions de sels qui interdisent l'emploi de certains procédés de dosage. Dans quelques cas, on a utilisé la séparation des bases sur Amberlite IRC-50 sous sa forme acide (H^+). L'élution est alors très facile et est obtenue au moyen de solutions diluées d'acide acétique. Ceci est particulièrement intéressant dans l'isolement de petites quantités de ^{14}C-spermidine et de ^{14}C-adénosylméthionine.

(*) DNP-polyamines : Dinitrophényl-polyamines.

La chromatographie sur papier a été mise en œuvre pour la séparation et l'identification de quantités minimes de substance. Peu de solvants sont susceptibles de fournir des séparations convenables. Herbst, Keister et Weaver (81) ont étudié plus de cinquante solvants de constitution différente et n'en ont retenu que deux. Le premier est constitué de monoéthyléther de l'éthylène glycol, d'acide propionique et d'eau saturée de chlorure de sodium (70 : 15 : 15) et le second de *n*-butanol, d'acide acétique et d'eau (4 : 1 : 5). Fischer et Bohn (65) ont utilisé un solvant constitué de phénol en solution tamponnée à pH = 1. Ce solvant est obtenu en mélangeant à parties égales du phénol et un tampon préparé en additionnant 50 ml de solution 0,2 M de chlorure de potassium et 97 ml de solution 0,2 N d'acide chlorhydrique. Les chromatographies mono et bi-dimensionnelles sont effectuées sur papier Whatman n° 1.

Raina (134) a procédé à la séparation des polyamines par *chromatographie en couches minces*. La couche d'absorbant est constituée de Kieselgel G, le solvant par un mélange de monoéthyléther de l'éthylèneglycol, d'acide propionique et d'eau (77,5 : 15 : 7,5).

Plusieurs chercheurs (27, 31, 128) ont tenté d'effectuer la séparation chromatographique des polyamines par la technique en *phase gazeuse*. Cette méthode paraît particulièrement intéressante ; cependant aucune technique valable n'a été mise au point actuellement pour effectuer les séparations et les dosages des bases présentes dans les extraits tissulaires.

Certains auteurs (108, 65) ont proposé la séparation par *ionophorèse sur papier* (Herbst, Keister et Weaver (81), Van Rheenen (193). Les diamines aliphatiques (cadavérine et putrescine) ainsi que les polyamines sont convenablement séparées à l'aide de systèmes tampons dont les plus utilisés sont les suivants :

— solution 0,065 M d'acide sulfosalicylique ajustée à pH = 3,5 par addition de soude.

— solution 0,1 M d'acide citrique ajustée à pH = 6,5.

— solution 0,03 M d'acide citrique ajustée à pH = 3,5.

L'avantage de l'ionophorèse et de la chromatographie sur papier réside dans le fait que l'on dispose d'un document sur lequel on peut effectuer des microréactions plus ou moins spécifiques. Par leur nombre et leur variété, ces réactions conduisent à localiser les bases, à les identifier et éventuellement à les doser. Les réactifs utilisés sont les réactifs classiques à la ninhydrine (65, 81, 108) et les réactifs de Dragendorf (2). Ils ne permettent pas des déterminations quantitatives.

Dans ce domaine de nombreuses tentatives ont été effectuées (9, 42, 108, 112, 207). La réaction colorée des polyamines avec la *p*-nitraniline diazotée donne des chromogènes instables. La pulvérisation sur le chromatogramme de 2,4 dinitrofluorobenzène (DNFB) (94, 36) n'a pas donné entière satisfaction. Il en est de même de l'emploi de réactifs à l'acide

flavianique. Cet acide ne précipite la spermine que si celle-ci se trouve en quantité importante alors que la spermidine n'est pas du tout fixée par cet acide.

Seul l'amido-black a été retenu par Raina (134). C'est un colorant azoïque possédant deux groupements sulfonyles. Il donne des colorations très intenses et conduit à révéler de très petites quantités de polyamines (de l'ordre de 0,1 µg). Raina préconise d'opérer sur l'inonophorégramme séché à la température du laboratoire pendant une heure environ, puis de pulvériser sur le document une solution saturée d'amido-black dans un mélange constitué de méthanol, d'acide acétique et d'eau (2 : 1 : 7).

On sèche alors à l'étuve à 105° pendant 5 minutes. La difficulté de la méthode réside en l'élimination du colorant qui se trouve être très solidement fixé par la cellulose. Afin d'obtenir un fond pratiquement incolore il est nécessaire d'effectuer un lavage pendant 90 minutes par un mélange de méthanol et d'acide acétique (9 : 1). Il faut noter que la spermine donne avec le réactif un complexe de coloration bleuâtre, alors que la spermidine conduit à un spot coloré en gris. Les spots ainsi révélés, on découpe la surface de papier sur laquelle ils se trouvent, et on effectue l'élution des chromogènes par une solution diluée de soude. Dans cette liqueur les spectres correspondants aux colorations des complexes de la spermine et de la spermidine présentent un maximum d'absorption pour une longueur d'onde de 615 mµ. Cette méthode permet de doser environ 2 µg de chacune des deux polyamines avec une précision de ± 2 p. 100.

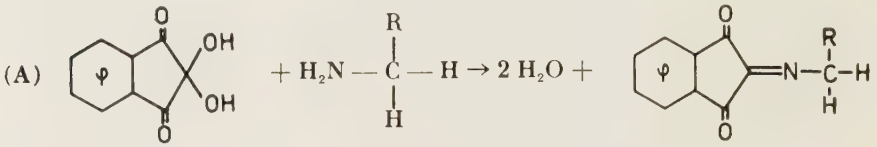
C. — TECHNIQUES COLORIMETRIQUES DE DOSAGE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE

La spermine et la spermidine ne présentent pas de caractère structural particulier permettant de disposer d'une méthode de dosage colorimétrique spécifique. Toutes les méthodes proposées jusqu'à ce jour sont basées sur la réactivité des groupements fonctionnels aminés et résultent de l'application des procédés généraux de dosage des amines.

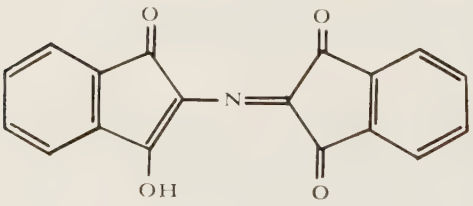
a) *Formation de complexes colorés avec l'ion cuivre :* Au contact de carbonate de cuivre, la spermine développe une coloration bleue (réaction de Tokuoka), alors que la spermidine conduit à une réaction beaucoup moins nette. Cette réaction, bien que sensible et peu spécifique, est utilisée par quelques auteurs en vue de la détermination des polyamines pour les besoins cliniques (7, 37, 146, 206).

b) *Réaction colorée avec la ninhydrine :* Cette réaction est classiquement mise en œuvre pour le dosage des acides aminés. Elle est sensible mais manque de spécificité. Neuberg (71) le premier, dès 1913, apporte la preuve qu'un grand nombre d'amines se comportent avec la ninhydrine d'une manière voisine de celle des amino-acides en donnant un pigment

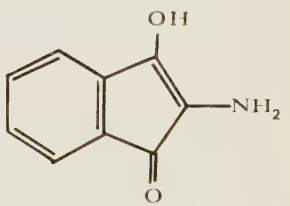
bleu. Les conceptions modernes sur la réaction de la ninhydrine avec les acides aminés permettent d'interpréter, tout au moins partiellement, le mécanisme de son action sur les amines (24). Tous les auteurs semblent d'accord sur la formation initiale d'une base de SCHIFF (128, 165, 202, 203), suivie d'un remaniement provenant de la migration d'un atome d'hydrogène :



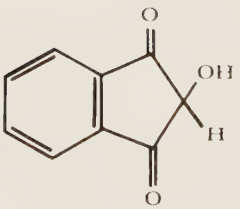
Ce dernier composé, ou bien conduirait au pourpre de RUHEMANN (*1*) par action d'une nouvelle molécule de ninhydrine (202, 203), ou bien s'hydrolyserait en dicéto 1,3-hydrindamine (*2*) (165), précurseur du pourpre de RUHEMANN, ou bien encore se transformerait en hydroxy-2-dicétohydrindène (*3*), puis en hydrindantine (*4*) dont le sel double obtenu avec l'excès d'amine serait responsable de la coloration bleue (127, 128).



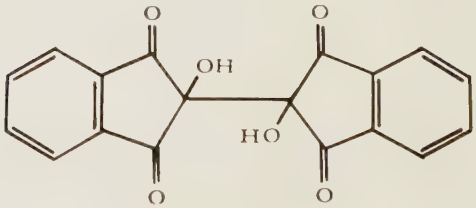
1



2



3



4

La réactivité des diamines aliphatiques a fait l'objet d'investigations quantitatives (71, 127, 204). Si l'octo et la décaméthylènediamine donnent toutes deux la quantité de pigment calculée en tenant compte de deux groupements aminés par molécule, la putrescine (tétraméthylènediamine), la cadavérine (pentaméthylènediamine) et l'hexaméthylènediamine ne donnent pas plus de chromogène qu'une monoamine. Yamagishi (204) pense que ce comportement résulte d'une cyclisation interne entre le groupement carbonyle libéré et la fonction amine qui n'a pas encore réagi. Quoi qu'il en soit, on constate expérimentalement qu'avec les diamines citées ainsi qu'avec la spermine et la spermidine, la réaction colorée est moins sensible qu'avec les amino-acides ; elle nécessite des températures et des durées de chauffage beaucoup plus importantes et manque de régularité. Si cette réaction est valable pour la détection des polyamines en général, elle n'a pas donné entière satisfaction pour les déterminations quantitatives des deux polyamines étudiées, bien qu'utilisée par certains auteurs en raison de sa commodité d'emploi.

c) *Réaction avec la* p*-nitraniline diazotée :* Beyer et Skinner (1940) (17) ont montré que le diazoïque de la *p*-nitraniline réagit avec les amines pour donner des composés colorés. Lahdevirta, Raina et Heikel (108) ont modifié la méthode originale pour l'appliquer aux dosages de la putrescine, de la cadavérine, de la spermine et de la spermidine.

Cette méthode consiste, dans un premier temps, à préparer le diazodérivé de la *p*-nitraniline par action du nitrite de sodium en milieu chlorhydrique sur l'aniline en opérant à basse température. Dans un deuxième temps, le diazoïque réagit sur les polyamines. La coloration est développée par neutralisation du milieu à l'aide du carbonate de sodium, suivie d'une alcalinisation par la soude. La coloration est extraite par le butanol. Le procédé est valable pour des quantités de produits comprises entre 10 et 200 µg de chlorhydrate de base. Il présente une précision de ± 10 p. 100 pour le dosage de la putrescine et de la cadavérine et de ± 5 p. 100 dans le cas du dosage des deux autres polyamines.

d) *Dosage par l'intermédiaire des dérivés dinitrophénylés :* Sanger (162) a décrit la grande réactivité du 2,4 dinitrofluorobenzène (DNFB) vis-à-vis des groupements aminés libres. Par la suite, Mc Intire et coll. (162) utilisèrent ce réactif pour l'analyse des monoamines primaires et secondaires. Les dérivés dinitrophénylés (DNP) insolubles dans l'eau, sont solubles dans le cyclohexane et le tétrachloréthane. L'extraction des DNP-dérivés jaunes par l'un ou l'autre solvant, permet d'obtenir des solutions dont la mesure de l'absorption colorimétrique permet d'effectuer indirectement le dosage des amines. La sensibilité de la réaction et sa rapidité ont été augmentées à la suite des recherches de Dubin (42). Ce dernier utilise comme solvant le dioxane qui, miscible à l'eau, conduit à la dissolution dans la liqueur des DNP-dérivés.

La méthode proposée consiste à disposer d'une solution aqueuse d'amine contenant de 10 à 150 mµeq de groupements aminés primaires ou secondaires libres. La liqueur neutralisée est additionnée d'une solution

acétonique de DNFB diluée extemporanément au dixième dans une solution aqueuse de tétraborate de sodium. On chauffe alors 10 minutes à 65°. On ajoute enfin une solution à 1 p. 1.000 d'acide chlorhydrique dans le dioxane. On détermine l'intensité de l'absorption de la coloration de la solution au spectrophotomètre pour une longueur d'onde convenable. Les DNP-dérivés de certaines polyamines se dissolvent immédiatement dans le milieu ; pour d'autres cependant, la dissolution est plus longue et peut être obtenue en 20 minutes à la température ordinaire ou plus rapidement en s'aidant d'un léger chauffage.

Lorsqu'on désire doser les polyamines dans les effluents de chromatographies sur colonne contenant un acide fort et volatil tel que l'acide chlorhydrique, il est nécessaire de procéder à l'élimination de celui-ci. On obtient l'évaporation du solvant dans un exsicateur sous vide en présence de potasse. On pratique sur les résidus ainsi obtenus la réaction telle qu'elle vient d'être décrite. Ce procédé permet de doser de 1 à 10 µg de spermine et de spermidine.

Dubin a montré que les DNP-dérivés des amines primaires et des amines secondaires présentent des spectres d'absorption différents (voir figure n° 2).

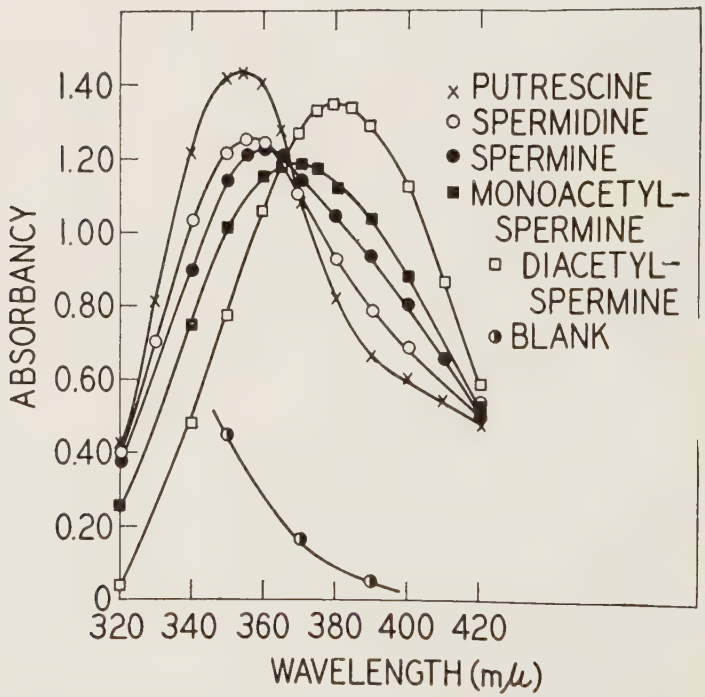


Figure n° 2. — *Spectres d'absorption des dérivés dinitrophénylés de diverses polyamines* (Dubin, 42).

D. — CARACTERISATION DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE

La composition chimique des deux bases étant extrêmement voisine, l'analyse élémentaire ne présente qu'un faible critère d'identification. En ce qui concerne la détermination des poids moléculaires, celle-ci ne peut être faite ni sur les bases ni sur les chlorhydrates. Seuls les dérivés du type polyamide benzoïque (46) sont utilisables. L'analyse fonctionnelle qui implique le dosage des groupements aminés primaires par un procédé convenable (la méthode de Van Slyke est la plus indiquée) conduit, dans une certaine mesure, à l'identification. On notera au passage que la caractérisation d'un homologue supérieur ou inférieur des bases, ne se différenciant que par un seul groupement méthylénique — CH_2 —, est particulièrement délicate.

A l'heure actuelle, le procédé d'identification de choix consiste en l'établissement du spectre infrarouge de ces composés. Les spectres de référence ont été publiés par plusieurs auteurs (58, 100, 102, 160). Ces documents permettent à la fois l'identification d'un échantillon et la confirmation de la structure de ces molécules. Nous présentons dans la figure n° 3 les spectres infrarouges du chlorhydrate de spermine et du chlorhydrate de spermidine.

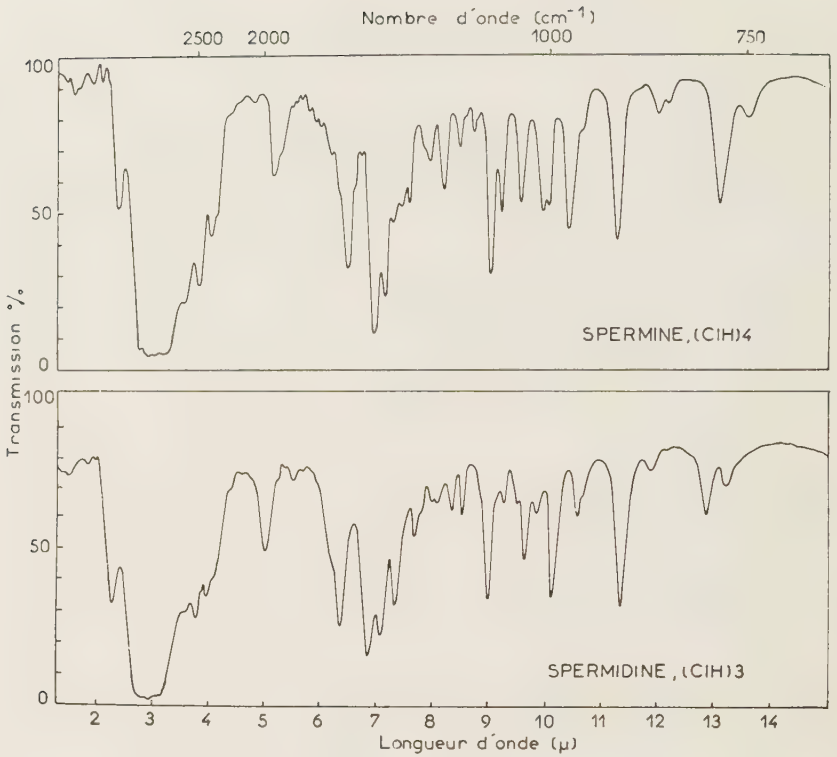


Figure n° 3. — *Spectre infrarouge de la spermine et de la spermidine* (C. Dumazert) (58).

III. - BIOCHIMIE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE

A. — BIOSYNTHESE

La biosynthèse de la spermine et de la spermidine a été étudiée chez les micro-organismes et chez les animaux supérieurs. Nous résumerons ci-dessous les principales données correspondant aux étapes biologiques qui ont été montrées comme conduisant à l'obtention de ces bases chez les êtres vivants.

a) Biosynthèse de la spermidine :

1. *Chez les micro-organismes :* les premières études ont été consacrées à mettre en évidence les précurseurs biologiques de cette polyamine. Conduites sur les cultures en croissance d'*E. coli* et d'*A. nidulans,* elles ont eu pour but de suivre l'incorporation de ^{14}C-ornithine et du 1,4 diaminobutane marqués au ^{14}C et à l'^{15}N. (184, 185). Ces travaux ont confirmé que le 1,4 diaminobutane était un produit de dégradation normal de l'ornithine et que la diamine apporte directement sa molécule à l'édification de la spermidine. Greene (70) montra par la suite que la chaîne amino-propyle provient de la méthionine. Ce fait fut établi par l'étude des cultures de *N. crassa* cultivé sur un milieu contenant de la ^{14}C-méthionine, le carbone radio-actif étant fixé sur le Cα de l'amino-acide.

La figure n° 4 résume les différents stades de la biosynthèse de la polyamine. Elle est l'aboutissement des trois étapes suivantes :

— dans un premier temps la méthionine et l'ATP conduisent à la S-adénosylméthionine. Cette étape est commune à la biosynthèse de la spermidine et aux réactions de transméthylation. Cette réaction est sous la dépendance d'un enzyme qui a été purifié à partir des extraits de cultures d'*E. coli.*

— la S-adénosylméthionine est décarboxylée en présence d'une adénosyl-décarboxylase exigeant la présence dans le milieu d'ions magnésium. La décarboxylase a été également purifiée à partir de culture d'*E. coli.*

— enfin le radical aminopropyle est transféré sur le 1,4 diaminobutane. Cette réaction de transfert de radical est catalysée par une transférase qui a été obtenue à l'état purifié à partir d'extraits de cultures d'*E. coli.*

Figure n° 2 - Biosynthèse de la spermidine

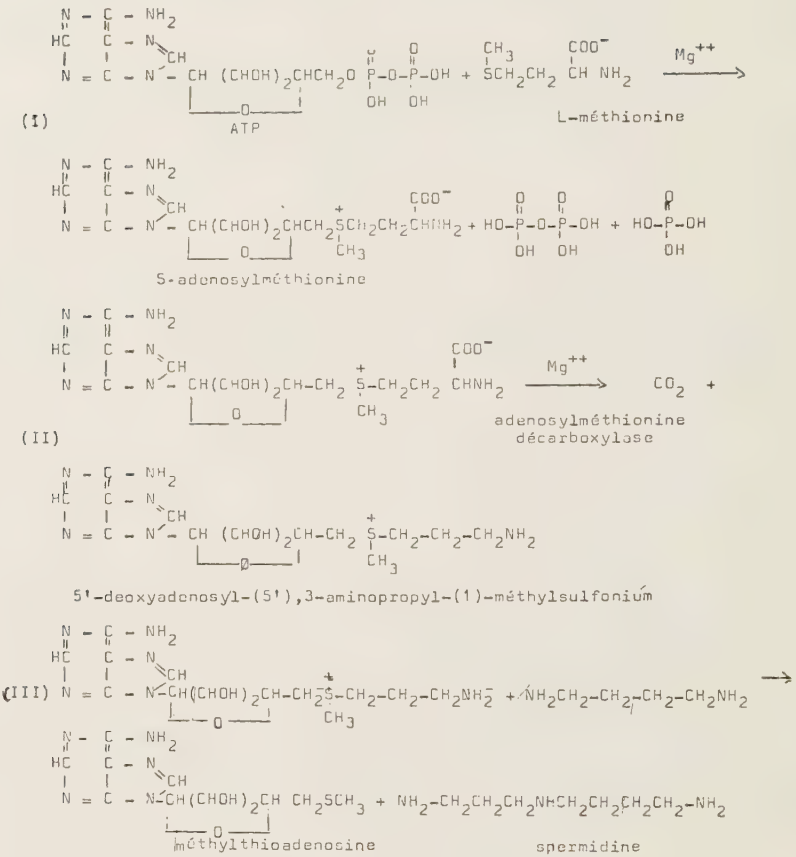


Figure n° 4. — *Schéma de la biosynthèse de la spermidine.*

2. *Chez les animaux supérieurs :*

Le mécanisme de la biosynthèse de la spermidine chez les animaux supérieurs n'est pas encore élucidé. Seules des preuves indirectes semblent montrer qu'elle s'opère selon un processus analogue à celui montré chez les micro-organismes. Raina (136) a étudié l'effet de l'éthionine sur la biosynthèse de la spermidine chez l'embryon de poulet. L'éthionine présente le caractère de substance compétitive vis-à-vis de la méthionine. Elle doit modifier quantitativement la biosynthèse de la polyamine. Effectivement Raina constate une diminution de la production de spermine et de spermidine après l'administration d'éthionine. De même, la présence de ce composé diminue l'incorporation de la ^{14}C-méthionine dans les polyamines.

D'autres expériences (134) utilisant des molécules marquées montrent que l'ornithine, la putrescine et la méthionine sont des précurseurs de la biosynthèse de la spermine et de la spermidine. Par contre, l'administration de glucose et de proline marqués ne conduit pas à l'apparition de radioactivité dans les molécules de polyamines.

Chez le rat (136), l'administration de doses importantes d'éthionine provoque, dans les trois jours qui suivent, une teneur inférieure des foies de 30 p. 100 de la spermidine et de 50 p. 100 de la spermine par rapport à celle des foies d'animaux témoins. Ceci pourrait refléter un turn-over élevé des polyamines. Tabor, Rosenthal et Tabor (185) ont décrit l'incorporation de ^{14}C-^{15}N-putrescine dans les polyamines en expérimentant sur des coupes de prostate de rat.

Il semble donc que la spermidine et la spermine soient synthétisées de la même façon chez les animaux supérieurs et chez les micro-organismes. Bien que les résultats mentionnés aient été obtenus chez des animaux nouveau-nés, il paraît logique d'admettre que la biosynthèse suit un processus identique chez l'adulte.

b) Biosynthèse de la spermine :

Jusqu'à présent on a essayé, sans succès, d'établir les étapes de la biosynthèse de la spermine. On suppose que le mécanisme est comparable à celui décrit pour la spermidine (185). Les expériences impliquant l'emploi de molécules marquées montrent que la putrescine est bien la source de l'enchaînement diaminobutane de la polyamine, mais que la diamine se trouve tout d'abord incorporée à la spermidine. Lorsque l'on utilise la ^{14}C-méthionine on retrouve l'atome traceur dans les enchaînements isopropyls en quantités équivalentes dans les deux bases. On peut donc admettre que la spermidine constitue le précurseur de la spermine. Cette dernière résulterait d'un nouveau transfert de radical entre la spermidine et la S-adénosylméthionine. Cependant, aucun enzyme éventuellement responsable de cette réaction n'a été mis en évidence.

B. — METABOLISME

Les voies de dégradation et d'utilisation de la spermine et de la spermidine chez les êtres vivants sont encore mal connues. On a pu décrire une dégradation oxydative des polyamines et montrer que ces bases sont impliquées dans certaines réactions de transfert de radicaux.

a) Oxydation enzymatique :

1. *Chez les bactéries :* La dégradation de la spermine et de la spermidine par un processus oxydatif a été observée tout d'abord par Silvermann et Evans (174) sur des cellules entières ou sur des préparations lyophilisées

de *P. pyocyanae*. On a pu mettre en évidence que d'autres bactéries étaient susceptibles de provoquer l'oxydation des polyamines [*M. smegmatis* (14), *H. parainfluenzae* (196) et *P. tularensis* (196)]. Par contre, l'activité spermine-oxydase n'a pas été rencontrée chez les colibacilles et *S. aureus* (139, 153, 174). Cette voie métabolique n'est donc pas générale chez les micro-organismes.

2. *Chez les animaux supérieurs :* Le seul enzyme connu, présent dans les tissus animaux et capable de catalyser la désamination oxydative de la spermine et de la spermidine, est une amino-oxydase plasmatique (89, 90). Cet enzyme a été purifié (69, 161, 183, 201) et obtenu à l'état cristallisé (19) à partir du plasma de bœuf. L'activité amino-oxydase est présente dans le plasma de plusieurs animaux (mouton, chameau, girafe, chèvre, lama, fauves, etc.) (19, 20, 89, 90). L'activité enzymatique varie avec l'âge du sujet. Blaschko (20) n'a trouvé que très peu ou même pas du tout de spermine-oxydase dans le sérum de chevreaux nouveau-nés. Le taux augmente nettement au cours des premiers mois qui suivent la naissance.

3. *Chez les végétaux :* La spermine et la spermidine sont oxydées par des préparations de diamine-oxydase d'origine végétale, en particulier dans les extraits obtenus à partir de semences de pois (87, 118, 197).

4. *Mécanisme de l'oxydation :* Le mécanisme exact de la dégradation oxydative des polyamines n'est pas encore élucidé. Tabor, Tabor et Rosenthal (183) indiquent qu'au cours de la réaction d'une molécule de polyamine, deux équivalents d'oxygène sont utilisés avec apparition de deux molécules d'ammoniac et de deux molécules d'eau. Il est probable que l'un des produits formés soit un amino-aldéhyde. Un tel composé, très probablement volatil, rend difficile l'identification de l'ammoniac. Il serait, de plus, très réactif et impliqué dans plusieurs réactions secondaires. Ceci explique que ce composé n'ait pu être isolé et qu'il soit encore hypothétique.

Quoi qu'il en soit, les considérations relatives aux possibilités réactionnelles des deux bases montrent que quatre points de rupture peuvent être théoriquement proposés dans le cas de la dégradation de la spermidine et six dans le cas de la spermine (figure n° 5).

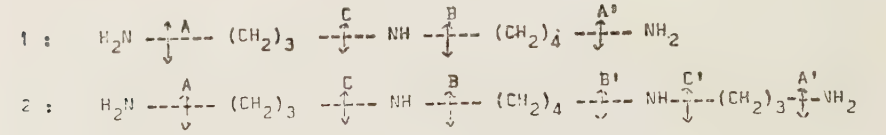


Figure n° 5. — *Possibilités réactionnelles de l'oxydation de la spermidine (1) et de la spermine (2).*

Les travaux entrepris dans cette voie montrent que la spermidine est un produit d'oxydation de la spermine (12, 183), donc que la rupture

de cette dernière molécule se situe en C et C'. Razin et coll. (137, 139) ont rencontré comme produit de dégradation de la spermine par *P. aeruginosa* le 1,3 diaminopropane, l'acide γ-aminobutyrique, la β-alanine et un aldéhyde non identifié. On peut donc penser qu'après une première étape conduisant en une rupture en C', un amino-aldéhyde et de la spermidine se forment ; la réaction se poursuit en B pour donner du 1,3 diaminopropane et du γ-aminobutyraldéhyde. Enfin une dernière étape conduit à la β-alanine et à l'acide γ-aminobutyrique.

b) Réactions de transfert de radicaux :

1. *Transglutamination :* On a isolé de différents tissus de mammifères un enzyme qui catalyse l'échange du groupement amine de certaines protéines avec quelques amines dont la spermine. Cet enzyme purifié à partir d'extrait de foie de cobaye, nécessite, pour être actif, la présence de l'ion calcium (32, 33, 34, 129, 163).

2. *Transamidination :* En 1956 Roche et coll. (149) mettaient en évidence chez la sangsue *(Hirudo medicinalis)* une guanidine monosubstituée nouvelle, présente en quantité importante dans tous les tissus, et en particulier dans le muscle où elle se trouve comme unique dérivé guanidylé. A ce titre on peut penser qu'elle constitue la base d'un nouveau « phosphagène ». Ce composé a reçu le nom d'*hirudonine*. La structure de cette substance a été élucidée et elle s'est avérée correspondre au N(3-guanidopropyl)-4 amino-butylguanidine ou diamidinospermidine (147) :

$$NH = C(NH_2)—NH—(CH_2)_3—NH—(CH_2)_4—NH—C(NH_2) = NH$$

La synthèse de cette molécule par guanidylation de la spermidine au moyen de la S-méthylisothiourée a confirmé la structure de l'hirudonine. Ce composé donne la réaction de Sakaguchi mais ne réagit pas avec la ninhydrine.

Le picrate et le chloroplatinate de la diamidinospermidine se sont avérés identiques aux sels correspondants de l'hirudonine et ils présentent en particulier le même comportement chromatographique sur colonne d'échangeurs d'ions et sur papier.

Ce dérivé se forme par transamidination (148) à partir de l'arginine comme le montre le fait que l'injection de ^{14}C-arginine chez la sangsue conduit à la formation d'hirudonine marquée. Il paraît très probable, bien que cela ne soit parfaitement démontré, que la transamidination se produise au niveau de la spermidine.

c) Activation des systèmes enzymatiques :

Martin et Ames (119) ont montré qu'au cours de l'incorporation de ^{14}C-phénylalanine au niveau des protéines ribosomales chez *S. typhi-*

murium, en présence d'un ARN messager artificiel : l'acide polyuridylique, la spermine est susceptible de remplacer l'ion magnésium. La polyamine serait un activateur, chez les micro-organismes aussi bien que chez les mammifères, de la biosynthèse protéique. Amoz et Mager (5) ont récemment montré l'effet stimulateur de la spermine au cours de l'incorporation de la ^{14}C-leucine dans les protéines nucléaires du thymus.

C. — REPARTITION DES POLYAMINES

La spermine et la spermidine sont présentes dans tous les êtres vivants.

a) *Chez les virus :* La concentration en polyamines des bactériophages varie de façon notable avec le type du virus et avec la teneur en polyamines de la cellule hôte. Les bactériophages type T (T_2, T_4, « 3 ») d'*E. coli* possèdent une très grande quantité de bases puisqu'elles représentent environ 40 p. 100 des composés cationiques (3, 4, 98). Chez le bactériophage T_4 par exemple, les concentrations de 1,4 diaminobutane et de spermidine sont voisines de 250 µmoles par gramme de poids sec. Ce sont les concentrations les plus élevées que l'on ait pu observer dans les êtres vivants. L'emploi de molécules marquées montre que ces polyamines dérivent directement de la bactérie-hôte. Rien ne permet d'affirmer que la synthèse de nouvelles molécules soit induite spécifiquement par l'affection virale. Ainsi les quantités de chaque polyamine trouvées chez ces virus dépendent de leur concentration dans la cellule contaminée. Si avant l'infection la concentration en polyamines est modifiée dans celle-ci par un changement des conditions de culture ou par addition d'une amine exogène, on observe des variations similaires dans la composition du bactériophage (97).

On n'a pu mettre en évidence que très peu de spermine et de spermidine dans les virus de la mosaïque du tabac, de la tomate, du concombre et de la poliomyélite (3).

b) *Chez les micro-organismes :* On a signalé la présence de polyamines dans diverses bactéries et levures (65, 70, 83, 186). Bien que les quantités trouvées soient variables, certaines cellules ont une teneur élevée en polyamines. Des études précises sur *E. coli* (43, 153) ont montré la présence de spermidine libre et de divers dérivés de cette base (monoacétylspermidine et dérivés du type glutathion).

Certaines levures contiennent de la spermine (*A. nidulans, S. cerevisiae*). Herbst et coll. (83) ont montré qu'en général les germes Gram + ne contiennent pas ou très peu de polyamines, alors que les germes Gram — en renferment des teneurs élevées.

La concentration en polyamines varie avec le pH et la composition du milieu de culture (153, 186). De nombreux micro-organismes prélèvent

rapidement les amines du milieu et il s'ensuit des variations notables du contenu intracellulaire en amines libres et en leurs dérivés. La teneur en amines augmente en présence d'arginine et de lysine (123).

La présence en quantité importante de polyamines chez les bactéries, telles qu'*E. coli,* cultivées sur milieu pauvre en glucose et en sels minéraux incite à penser que les polyamines sont des composés indispensables à la vie et non de simples produits de déchet ou de détoxication.

c) *Chez les animaux supérieurs :* Le pancréas, le foie et la prostate ont la plus forte teneur en spermine et en spermidine parmi les tissus animaux. Les liquides biologiques : sang, urine, suc pancréatique n'en renferment pratiquement pas. Le sperme, qui peut être considéré comme un tissu particulier, renferme chez l'homme une quantité très élevée de spermine (3,3 mg/g). Cette polyamine se trouve en plus grande proportion dans le liquide spermatique que dans les spermatozoïdes. Le sperme a une teneur variable en spermine selon l'espèce animale considérée : le sperme de taureau n'en renferme que de faibles quantités (0,023 mg/g). Le sperme est pratiquement dépourvu de spermidine. Cet ensemble de données permet de conclure que les polyamines sont essentiellement des composés intracellulaires.

La répartition intracellulaire des polyamines est encore imprécise. Zillig et coll. (207) ont montré la présence de spermine dans les ribosomes du foie, tandis que plusieurs auteurs, parmi lesquels Kosaki (104, 105), trouvent de la spermine combinée dans un phosphatide isolé de cellules tumorales : le malignolipide. L'existence de ce composé n'a cependant pas été confirmée (86, 96, 164, 205). La spermidine est un constituant important d'une substance basique isolée des glandes mammaires du rat : la mammamine (106).

Chez le rat la spermine et la spermidine se retrouvent en quantités plus importantes dans les lobes dorso-latéral et ventral de la prostate que dans les lobes antérieurs (144). Les vésicules séminales ne sécrètent pas de polyamines.

La teneur en polyamines des tissus dépend de l'âge et de l'espèce animale (voir tableau I).

TABLEAU I

Teneurs en spermine et en spermidine (en µg par g de tissus frais) du foie de rat dans diverses conditions d'après Rosenthal *et* Tabor (156).

	Spermine	Spermidine
Adulte	235	230
Nouveau-né	90	445
Adultes soumis à la diète	210	126

Le rapport de la teneur en spermine et en spermidine varie considérablement d'un organe à l'autre. Cependant, pour un même tissu et pour une espèce animale donnée, on peut considérer que ce rapport est, dans une certaine mesure, caractéristique.

Des déterminations en polyamines ont été effectuées sur des tissus atteints d'affections malignes (156). Les valeurs trouvées sont rassemblées dans le tableau n° II.

TABLEAU II

Teneurs en spermine et en spermidine (en µg par g de tissus frais) de tissus atteints d'affections malignes (chez la souris) d'après ROSENTHAL *et* TABOR (156).

Nature de l'affection maligne	Spermine	Spermidine
Lymphome	70	351
Sarcome	160	380
Hépatome	63	230
Carcinome	234	180
Cancer mammaire	148 - 210	180 - 217
Tumeur de la parotide	80	100

d) *Chez les animaux inférieurs :* La spermine a été identifiée dans le venin de l'araignée (*Pamphobetus tetracanthus,* 45) et chez les oursins (*Echinococcus mirabilis,* 131). ACKERMANN (1, 2) a montré que la quantité de spermidine diminue considérablement au cours de la mue du ver à soie (*Bombyx mori*).

e) *Chez les végétaux :* La distribution des polyamines chez les végétaux n'a pas fait l'objet de travaux importants. On a trouvé de la spermidine dans certaines espèces de chou de Chine et dans les feuilles de tomates. A la suite de la découverte de la cadavérine, de la putrescine, de la spermine et de la spermidine dans les germes de blé, MORUZZI et CALDARERA (126) ont étudié la teneur d'autres céréales en polyamines. Le tableau n° III contient les résultats de leurs déterminations.

TABLEAU III

Teneur en polyamines de germes de céréales (µg/g de germe frais)

Germes	Cadavérine	Putrescine	Spermidine	Spermine
Orge	234	136	291	128
Riz	133	69	153	141
Avoine	71	53	307	109
Maïs	17	12	124	90
Blé	56	43	254	41
Sorgho	18	14	83	21

L'examen des résultats contenus dans le tableau n° III montre que les polyamines existent en quantité appréciable dans les germes de céréales. La spermidine est le composant principal tandis que la cadavérine et la putrescine se rencontrent à des concentrations plus faibles excepté dans les grains d'orge.

Récemment les polyamines ont été identifiées comme constituants essentiels de trois alcaloïdes :

— la *pithécolobine* extraite de *Pithecolobium saman.*

— la *palustrine* retrouvée dans plusieurs plantes du genre *equisetum.*

— la *lunarine* isolée des semences de *Lunaria biennis.*

D. — ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE

a) *Action des polyamines sur la stabilité des membranes cellulaires :*

Lorsque l'on traite des bactéries par de l'eau distillée ou par des solutions hypo ou hypertoniques, on note une lyse bactérienne importante. La rupture de la membrane cellulaire est due à la différence existant entre les pressions osmotiques du milieu extérieur et du contenu cellulaire. Mager (113) a montré chez *P. tularensis* et chez *A. Fischeri* que la lyse microbienne est prévenue par la présence dans le milieu de traces de spermine et de spermidine. Razin et Rozansky (140) observent le même phénomène avec *S. aureus* et Brown (26) sur diverses parois cellulaires.

Il est à remarquer que ces résultats sont obtenus avec de très faibles concentrations (0,001 M) de spermine si on les compare à celles de sucrose (0,5 M) utilisées généralement.

Mager (114) et Tabor (178) montrent qu'il se produit un phénomène semblable au niveau des sphéroplastes et des protoplastes bactériens. Lorsque l'on traite *E. coli* par du lysozyme et de l'acide éthylènediaminetétracétique dans un milieu contenant 20 p. 100 de sucrose, les bactéries sont transformées en sphéroplastes et détruites quand la pression osmotique extérieure baisse (143). On prévient cette lyse par des concentrations 0,001 M de spermine, de spermidine, de chlorure de calcium, de quinacrine et de streptomycine. Bien que l'intérieur des cellules présente, à l'état normal, une pression osmotique plus élevée que celle du milieu extérieur, les cellules ne gonflent pas en raison de la rigidité des membranes cellulaires. Les membranes modifiées par l'action du lysozyme, sont plus fragiles : le sphéroplaste gonfle jusqu'à éclater et la lyse survient. Le sucrose prévient cette lyse en augmentant la pression osmotique du milieu extérieur. Une polyamine à la concentration 0,001 M ne peut agir de la même manière.

Ce phénomène n'a pas reçu d'explication satisfaisante. On peut penser que les composés basiques forment des complexes stables avec les groupements fonctionnels acides des molécules constituant l'enveloppe cellulaire. Il y aurait une diminution des forces de répulsion entre ces groupements de même signe électrostatique et une augmentation des forces de cohésion (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la spermine se lie effectivement aux sphéroplastes, aux phospholipides et à d'autres composants de la membrane cellulaire (13, 140, 179).

Des phénomènes identiques sont visibles au niveau des inclusions intracellulaires. De faibles concentrations de spermine ou de spermidine (de 0,001 M à 0,0001 M par litre) inhibent le gonflement des mitochondries causé par un milieu hypotonique ou acide contenant les acides glutamique, succinique, ascorbique ou oléique (84).

L'addition des polyamines aux membranes cellulaires, conduisant vraisemblablement à la formation de ponts, peut expliquer certaines observations. C'est ainsi que l'addition de spermine à des suspensions de bactéries Gram + ou Gram — de la forme R (140) provoque une agrégation de celles-ci. Ceci semble indiquer une inter-réaction entre les polyamines et les groupements acides des différentes surfaces cellulaires.

On a également observé que la spermine diminue les effets néfastes de la dilution sur les spermatozoïdes de lapin, de souris, de rat, de cobaye ; cependant la polyamine n'agit pas sur ceux du taureau, du bélier, de la grenouille et de l'homme.

b) *Combinaison des polyamines et des acides nucléiques :*

La spermine et la spermidine peuvent se lier aux acides nucléiques (ARN et ADN) pour fournir des complexes insolubles en milieux suffisamment concentrés. Ces complexes s'établissent par liaisons ioniques entre les groupements basiques des polyamines et les fonctions acides phosphoriques des acides nucléiques. Cette neutralisation conduit à une élévation des forces de cohésion et à une augmentation de la stabilité des structures secondaires le long de la double hélice de l'ADN.

Les inter-réactions ADN-polyamines sont notamment mises en évidence au cours de la dénaturation de l'acide nucléique par la chaleur. En présence de polyamines (10^{-4} M pour la spermine et 2.10^{-6} M pour la spermidine) il faut élever considérablement la température du milieu pour obtenir une dénaturation (184). Keister (99) observe que l'addition de spermine à une solution aqueuse d'acide ribonucléique entraîne une diminution de l'absorption de la liqueur en lumière ultraviolette pour une longueur d'onde de 260 mμ. Felsenfeld et Huang (62, 63) montrent par des techniques spectrophotométriques que les polyamines facilitent la formation de copolymères à deux chaînes à partir de polynucléotides à un seul enchaînement. Ainsi, si l'on ajoute des diamines à des milieux

contenant un mélange d'acides polyadénylique (poly-A) et polyuridylique (poly-U), la densité optique de la liqueur décroît, probablement par formation d'un dimère poly-(A+U). Tout ceci semble traduire une association amines-nucléotides. Les liaisons salines des copolymères se forment lorsque les groupements phosphoriques sont neutralisés par les groupements aminés.

Cantoni (28) précise qu'une fraction de l'acide ribonucléique soluble (ARNs) est séparée par précipitation spécifique de l'ANRs-spermine, dans des conditions de pH et de force ionique convenables. L'inter-réaction spermine-acide nucléique a été démontrée *in vitro* alors que l'intérêt de telles associations *in vivo* n'a pu être élucidé. On peut rapprocher ce phénomène de l'action des protéines fortement basiques (protamines et histones) qui, elles aussi, se combinent aux acides nucléiques.

Ce pouvoir d'agglomération des structures nucléoprotidiques peut expliquer certaines constatations relatives aux comportements des ribosomes et des noyaux cellulaires en présence de polyamines. Plusieurs auteurs ont obtenu des associations ribosomales formant des particules de volume important à partir d'*E. coli* (35) et de *S. typhimurium* (119) mis en présence de spermine et de spermidine. Cohen et Lichtenstein (35) ont suggéré que la spermidine et l'ion magnésium constituent des liens naturels des composants du complexe ribosomal bactérien. En l'absence de ces substances, les grosses particules se dissocient en unités plus petites. Dans certaines conditions, la spermine et la spermidine provoquent une agrégation visible des ribosomes (172) et des microsomes (178).

L'action des polyamines sur les noyaux isolés des cellules hépatiques du rat dépend de leurs concentrations. Les teneurs en bases de l'ordre de 0,001 M provoquent une contraction du noyau et une condensation des nucléoles. Pour des concentrations plus élevées on note un gonflement du noyau.

Une autre série d'observations montre indirectement l'action des polyamines sur les particules sub-cellulaires. Ainsi, lorsque l'on traite des ribosomes pancréatiques par une liqueur contenant de la spermine, on constate que 80 à 90 p. 100 de l'amylase, de la ribonucléase et du chymotrypsinogène sont libérés (171, 172). Par contre, toutes les protéines du ribosome ne sont pas libérées par la polyamine (172).

Cet ensemble de données expérimentales montre donc que la spermine et la spermidine, de par leur caractère polyfonctionnel base forte, agissent sur les structures complexes. Par un effet de neutralisation de charges ioniques, il semble logique d'admettre ou qu'elles puissent lier plus fortement certains constituants ou que, par un effet de déplacement compétitif, elles conduisent au contraire à une libération de composés, actifs biologiquement, élaborés en certains points de la cellule mais dont l'action doit se manifester en un site autre du contenu cellulaire.

c) *Action des polyamines sur la prolifération cellulaire et la germination :*

L'activité de la spermine et de la spermidine en tant que facteurs de croissance se manifeste selon plusieurs modalités. Certains micro-

organismes ont un besoin strict en polyamines, pour d'autres les polyamines n'influent que sur la première étape de la croissance.

Herbst et Snell (82) ont démontré les premiers le caractère indispensable des polyamines en utilisant des souches de *H. parainfluenzae* 7901. Sur milieu purifié, en l'absence de polyamines, aucun développement du micro-organisme n'est enregistré. Par contre la présence de 1,4 diaminobutane, de spermine, de spermidine ou d'agmatine provoque la germination.

Par la suite, Herbst et coll. (80) précisèrent que ce phénomène est général et que l'on peut utiliser une vingtaine de composés dérivant du 1,3 diaminopropane ou du 1,4 diaminobutane et comportant un groupement aminé non substitué.

A côté de ce besoin indispensable en polyamines chez certaines bactéries, on a décrit un besoin accessoire. Celui-ci se traduit par une augmentation du taux de croissance de plusieurs micro-organismes, notamment du *L. casei*. L'effet stimulateur est probablement indirect. Il semble en effet que les polyamines préviennent la lyse des bactéries fragiles (113).

La spermine et la spermidine favorisent également la multiplication cellulaire de cellules animales. Ham (74) a montré qu'en l'absence de sérumalbumine les polyamines favorisaient la multiplication des cellules souches CHD-3 du Hamster de Chine.

Récemment Bertossi et coll. (16) ont étudié les effets de la spermine sur la division cellulaire de tissus végétaux dont la croissance est en étroit rapport avec la présence d'auxines. Ces expériences menées sur des tubercules d'*Helianthus tuberosus* ont permis de conclure que la spermine est une substance de croissance susceptible de remplacer l'acide indolacétique dans la division cellulaire. Cependant chez certains végétaux (Vicia faba) la spermine provoque l'inhibition du déroulement chromosomique au cours de l'anaphase et de la télophase. La prophase a lieu normalement mais au cours de la métaphase les chromosomes fusionnent en une seule masse (40).

d) *Action antagoniste des antimicrobiens et activité antibactérienne de la spermine et de la spermidine :*

Une des toutes premières expériences ayant pour but de déterminer le rôle biologique des polyamines, a révélé que la spermine, la spermidine et plusieurs autres amines synthétiques se comportent comme des antagonistes de la quinacrine et de la quinine (121, 173, 174). La spermine prévient également l'inhibition du potentiel respiratoire provoquée par divers composés (quinine, protamine, bleu de méthylène, cristal violet, trypaflavine) chez les cellules de levure (120). Il a été également montré (23, 25) que les polyamines s'opposent à certains des effets de la streptomycine. Sevag et Drabble (169) démontrent que l'addition de spermine ou de spermidine prévient l'apparition d'individus résistants de *S. aureus*

et d'*A. aerogenes* lorsque des souches sensibles sont cultivées en milieu contenant de la streptomycine, de la pénicilline ou d'autres antibiotiques. On peut penser qu'en vertu du caractère base forte des polyamines, ces dernières entrent en compétition avec des agents inhibiteurs au cours de leur pénétration dans le milieu cellulaire.

Il faut également noter que, pour plusieurs bactéries et levures, la spermine et la spermidine, constituent des antibactériens (158, 159, 167, 181). La sensibilité des différentes espèces est très variable. D'une manière générale, la spermine a une activité plus élevée que la spermidine. En milieu alcalin l'activité est optimum et elle diminue avec l'abaissement du pH. On suppose que le pouvoir antimicrobien des polyamines est lié à la capacité de pénétration de l'amine dans la cellule. Rosenthal et Dubin (153) montrent que chez *S. aureus,* lorsqu'on ajoute de la spermine marquée au milieu de culture, 16 à 50 p. 100 de la polyamine se retrouvent dans les corps bactériens, alors qu'avec la spermidine seulement 5 p. 100 pénètre dans les cellules. On peut également penser que cette activité est en relation avec la formation de dérivés d'oxydation des polyamines, dérivés toxiques pour la cellule comme Hirsch et Dubos (88, 91) l'ont montré sur *M. tuberculosis.*

L'action antibactérienne de la spermine est annulée par de fortes concentrations de 1,4 diaminobutane, de certains cations minéraux, d'acides nucléiques, de mononucléotides, de lécithines et d'acides aminés basiques (18, 72, 138, 140).

IV. - PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE

Comme toutes les bases fortes, la spermine et la spermidine présentent une toxicité rénale marquée (Rosenthal et coll., 155). L'injection de 0,1 à 0,2 mmoles/kg (0,348 mg de chlorhydrate de spermine) provoquent une insuffisance rénale aiguë et la mort des animaux en 10 jours environ. On observe la nécrose des tubes contournés proximaux. Pour des doses sub-létales, on n'obtient pas chez l'animal de lésions chroniques. La spermidine est vingt fois moins toxique que la spermine.

On peut obtenir des lésions expérimentales chroniques chez le lapin soit par injections sous-cutanées et répétées de spermine amenant une fibrose et une hypertrophie bilatérale du cortex rénal, soit par injection de spermine dans l'artère rénale gauche provoquant une fibrose unilatérale et l'hypotrophie de la totalité du rein gauche. En outre, un certain nombre de lapins soumis à ce traitement présentent une cardiomégalie et une hypertension associées à ces lésions rénales chroniques (65).

La spermine présente une activité dépressive sur le système nerveux central, une action hyperglycémiante et anti-histaminique et peu d'effet sur la pression artérielle. Elle a une action diurétique marquée.

Elle possède un pouvoir anti-héparinique, ce qui paraît être en relation avec son caractère basique fort. En effet, des composés de charge analogue tels le lysozyme, les protéines perméthylées, les protamines ont une activité analogue (Dumazert et Ghiglione, 51, 52, 53).

Chez l'homme on peut observer que les injections intra-musculaires de spermine provoquent l'apparition d'albuminurie, d'hématurie et d'azoturie (146).

La présence d'amines biologiques dans les extraits de foie a suscité un certain intérêt consistant à considérer les éventuelles propriétés anti-anémiques de ces corps. C'est pourquoi nous avons jugé utile de consacrer les pages suivantes à cette question.

V. - LES ANÉMIES EXPÉRIMENTALES

Les diverses recherches effectuées sur les polyamines chez les mammifères ont eu principalement pour but d'étudier la répartition de la spermine et de la spermidine dans les divers organes, d'apprécier les variations de la teneur de ceux-ci en bases au cours de la croissance et de mettre en évidence le processus de la biosynthèse de ces cationoïdes. Aucun travail n'a été réalisé afin de suivre les variations de la concentration des organes en polyamines au cours des anémies expérimentales. Or on sait que celles-ci sont caractérisées par un faible nombre de globules rouges circulants dû à l'arrêt de la maturation de la lignée érythrocytaire et à une diminution de la résistance globulaire. Deux types d'anémies conduisent systématiquement à de tels résultats : l'anémie protéiprive et l'anémie par intoxication à la phénylhydrazine.

L'*anémie protéiprive* est obtenue chez le rat blanc après 30 à 35 jours de régime dépourvu de protides. Ainsi que l'ont montré A. et J. Roche on assiste à une perte azotée considérable qui ne peut être réparée que dans des conditions tout à fait particulières, si bien qu'en général, on la considère comme irréversible. L'examen du sang des animaux inanitiés montre la gravité de l'anémie dont ils sont atteints. Le nombre des hématies ne représente plus que 50 p. 100 de la valeur normale. Cette anémie est normo ou hypochrome [Aschkenasy (10), Artaud (8)]. On observe un nombre croissant de réticulocytes et une augmentation de la teneur du sang en érythroblastes lorsque la carence se prolonge. Ces données indiquent un rajeunissement de la population érythrocytaire du sang. Ceci s'explique par l'arrêt de la maturation de la ligne érythrocytaire qui se produit à deux stades de développement : un premier blocage qui empêche les érythroblastes de se débarrasser de leurs noyaux pour se transformer en réticulocytes, d'où accumulation de petites hématies nucléées (normocytes) à l'intérieur de la moelle, et un deuxième blocage qui s'oppose à la maturation des réticulocytes eux-mêmes. Diverses constatations conduisent à admettre que l'anémie protéiprive est due également à une hémolyse excessive par altération structurale des globules rouges et par absence de protection par le plasma dont la teneur en facteurs anti-hémolytiques (?) se trouve diminuée par suite de la carence.

Au cours de l'inanition protéique, Dumazert et Grac (55) ont montré que les réserves azotées hépatiques sont progressivement mobilisées. Elles subissent uniformément ce phénomène jusqu'à la période agonique, au cours de laquelle on note une rétention relative d'un constituant globulinique et un appauvrissement en fractions albuminiques. En dehors de cette période le foie maintient sensiblement constants les taux respectifs

de ses divers constituants protéiques. On peut donc espérer qu'au cours de l'anémie, les systèmes enzymatiques touchant au catabolisme et à l'anabolisme protidique ne sont pas modifiés tout au moins quantitativement. Seules leurs activités diminuent en l'absence d'apport exogène de protides.

L'*anémie par la phénylhydrazine* a été mise en évidence par HOPPE-SEYLER (92) chez le lapin et étudiée par de nombreux auteurs. FIESSINGER et LAUR (64) ont montré qu'hématologiquement, l'anémie est provoquée par une destruction hémolytique brutale, sans sidération de l'appareil hématopoïétique qui conserve, du moins chez le lapin, sa faculté réactionnelle dont l'importance de la réticulocytose constitue le plus sûr témoignage. Ces auteurs ont également établi ce qu'ils désignent sous le vocable de polytoxicité de la phénylhydrazine qui étend son action aux parenchymes rénaux et hépatiques. Il faut noter cependant que les lésions parenchymateuses et les altérations sanguines ont une faculté réparatrice marquée : dès l'arrêt des injections toxiques l'animal guérit.

Des données rassemblées sur la biochimie de la spermine et de la spermidine on peut retenir essentiellement les points suivants :

— ce sont des substances de caractères pratiquement intracellulaires stricts,

— elles sont synthétisées à partir de matériel protidique (méthionine, arginine),

— elles possèdent un pouvoir stabilisant des membranes cellulaires,

— elles ont la possibilité de contracter avec les nucléotides et les acides nucléiques des liaisons qui en modifient les propriétés.

Ces considérations conduisent à penser qu'il pourrait exister un lien entre les polyamines et les phénomènes observés au cours des anémies expérimentales en ce qui concerne d'une part l'arrêt de la maturation érythrocytaire en relation directe avec l'expulsion du noyau des érythroblastes donc avec la réactivité des nucléotides cellulaires, et d'autre part la diminution de la résistance globulaire que l'on peut supposer être due à une augmentation de la fragilité membranaire par absence d'un facteur stabilisant.

Il semble donc « à priori » intéressant d'établir un lien entre les teneurs tissulaires en polyamines et les phénomènes résultant d'anémies expérimentales obtenues soit à la suite d'une suppression de composés permettant la biosynthèse des polyamines (anémies protéiprives), soit par administration d'un facteur conduisant essentiellement à une destruction hémolytique brutale (anémie à la phénylhydrazine).

OBJET DU TRAVAIL

Tous les tissus renferment un ensemble de substances de caractère fortement alcalin constitué d'ions minéraux, des « amines biologiques » de GUGGENHEIM et de molécules plus complexes, en particulier polypeptidiques, riches en bases hexoniques (arginine, lysine et histidine). Nous proposons de désigner l'ensemble de ces constituants sous le terme général de « *cationoïdes* », car elles sont susceptibles de se fixer sur les résines à groupements fonctionnels acides échangeurs de cations. Parmi ceux-ci la spermine et la spermidine occupent une place de choix.

Comme il ressort de l'étude des données bibliographiques que nous avons rassemblées, nos recherches ont été tout d'abord consacrées à l'isolement des polyamines, à l'établissement de leurs structures, à leur synthèse et à la mise en évidence de leur répartition dans les tissus. Après une longue période de désintéressement, les travaux récents soulignent l'intérêt biologique des polyamines, précisent leur catabolisme et leur anabolisme ainsi que leur rôle dans certains phénomènes vitaux.

Les principales données établies l'ont été grâce à la mise en œuvre de spermine et de spermidine marquées à l'aide d'atomes radioactifs (carbone et azote). Ceci s'explique par les difficultés rencontrées aussi bien pour le dosage que pour l'identification des polyamines à l'échelle microanalytique. En effet, aucun de ces deux composés ne présente de caractère structural permettant la mise en jeu de procédés spécifiques. Bien que les méthodes modernes de séparation (chromatographie et ionophorèse) aient été, dans ce domaine, d'un apport considérable, il n'en demeure pas moins qu'aucun procédé commode, simple et précis de dosage n'a été proposé et qu'aucune méthode en vue de l'extraction des polyamines des homogénats tissulaires ne s'est avérée exempte de critiques. Aussi avons-nous jugé utile d'entreprendre des recherches dans le but de proposer des techniques nouvelles sur ces deux points particuliers de Biochimie analytique.

Vis-à-vis d'un grand nombre de réactifs précipitants (réactif de DRAGENDORF, acides flavianique et tungstique, sel de REINECKE...), la spermine et la spermidine se comportent comme des molécules fortement basiques possédant un groupement fonctionnel ammonium quarternaire. Aussi nous a-t-il paru logique de doser les polyamines selon la technique classique de KAHANE (44), technique de dosage des substances de cette nature (choline, bétaïne du glycocolle). Cette hypothèse de travail ayant été confirmée expérimentalement, nous disposions d'une méthode convenable de détermination de la spermine et de la spermidine.

Nous avons ensuite cherché à procéder à l'isolement de l'ensemble des *cationoïdes* à partir d'extraits tissulaires. Pour cela, nous avons fait appel à un procédé original consistant à faire agir simultanément sur le filtrat de déprotéinisation une résine cationique (R^-, H^+) et une résine anionique (R^+, HO^-) tout en évitant le mélange des grains à l'aide d'un diaphragme de toile. Les cationoïdes sont récupérés par élution au moyen d'une solution acide. Nous désignons ce procédé sous le terme *d'absorption par double échange simultané.*

Etant en mesure d'isoler et de doser la spermine et la spermidine ainsi que certains cationoïdes tissulaires, nous avons effectué de telles analyses portant sur divers tissus d'organes d'animaux différents (bœuf, rat, lapin).

Bien que la spermine et la spermidine soient des composés largement distribués, leur rôle exact dans les processus vitaux demeure encore obscur. Herbst et Coll. (80, 82) ont montré que ces polyamines sont des facteurs indispensables au développement de certains micro-organismes. Aussi nous sommes-nous proposée de rechercher ce caractère chez les mammifères par la mise en évidence de la biosynthèse préférentielle de ces composés au cours d'anémies expérimentales. Pour cela, nous avons procédé à deux groupes d'essais ; dans le premier, nous avons soumis des rats à l'inanition protéique ; dans le second, nous avons provoqué l'anémie par administration de phénylhydrazine chez le lapin et chez le rat. Dans ces deux cas, nous avons suivi les variations de la teneur en spermine et en spermidine de plusieurs organes en fonction de la durée de l'expérimentation.

EN RESUME, notre travail se divise en deux parties qui ont pour objet :

1° Sur le plan analytique, la mise au point et la justification d'une technique de dosage de la spermine et de la spermidine par la méthode de Kahane (44) et d'un procédé d'isolement des cationoïdes tissulaires par *absorption par double échange simultané.* Ceci nous a permis de proposer une technique d'ensemble pour doser certains constituants tissulaires de caractère fortement basique.

2° Sur le plan biochimique, nous nous sommes attachée à étudier la répartition de cationoïdes et, en particulier, de la spermine et de la spermidine dans différents tissus d'organes de bœuf, de rat et de lapin, et de suivre les variations de la teneur en polyamines de certains organes au cours d'anémies expérimentales (inanition protéique et intoxication par la phénylhydrazine).

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIERE PARTIE

CHIMIE ANALYTIQUE DE LA SPERMINE DE LA SPERMIDINE ET DE DIVERS CATIONOIDES

La première étape de nos recherches a consisté à mettre au point des techniques nouvelles dans le but de doser la spermine et la spermidine, d'extraire les cationoïdes des milieux complexes dans lesquels ils se trouvent à l'état naturel et, enfin, d'adapter une technique chromatographique sur résine échangeuse d'ions au problème que nous nous sommes posé.

C'est la description successive de ces méthodes et leur justification que nous exposerons dans cette première partie de notre Thèse.

CHAPITRE PREMIER

DOSAGE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE PAR PRÉCIPITATION SOUS FORME DE PERIODURE

Nous avons tout d'abord recherché si la spermine et la spermidine ne précipitaient pas avec un réactif classique des molécules à groupement fonctionnel ammonium quaternaire et en particulier avec le réactif de FLORENCE. ROMAN (150), ERICKSON, AVRIN, TEAGUE et WILLIAMS (60), REIFER (142) ont pu doser la choline par formation d'un periodure stable, insoluble, lequel est isolé à l'échelle micro-analytique et l'iode métalloïdique combiné déterminé par titrimétrie à l'aide d'une solution titrée d'hyposulfite de sodium. KAHANE (44) a modifié la composition du Réactif de FLORENCE et a décrit une méthode particulièrement intéressante pour effectuer le dosage de la choline et de la bétaïne du glycocolle.

Après avoir vérifié que les polyamines conduisent à des periodures insolubles par addition à leurs solutions aqueuses de réactif de KAHANE, nous avons mis au point une méthode d'analyse de la spermine et de la spermidine fondée sur la détermination des periodures de ces bases.

Nous décrirons dans ce présent chapitre la méthode que nous utilisons, les expériences nous ayant permis d'établir le coefficient d'analyse en déterminant la composition des periodures, ainsi qu'une étude de l'influence des sels minéraux sur leur précipitation.

I. — TECHNIQUE GENERALE DE PRECIPITATION ET DE DOSAGE DE LA SPERMINE ET DE LA SPERMIDINE SOUS FORME DE PERIODURE.

On place dans un tube à centrifuger de forme conique et de 10 ml de capacité, 5 ml de solution de chlorhydrate de spermine ou de chlorhydrate de spermidine, apportant de 0,2 à 1 mg de substance. On ajoute à cette liqueur 1,5 ml (soit 0,3 ml de réactif par ml de liqueur) de réactif de KAHANE (44), de composition suivante :

Iode	16 g
Iodure de potassium	24 g
Eau distillée q. s. p.	100 ml

Après homogénéisation on abandonne la préparation pendant deux heures au réfrigérateur à + 4° C. Au bout de ce temps on centrifuge et on élimine la liqueur surnageante par aspiration. Le précipité et le tube sont lavés à l'aide de 5 ml d'eau distillée glacée en prenant soin de ne pas remettre le précipité en suspension. On centrifuge et on élimine la liqueur de lavage comme précédemment. On renouvelle dans les mêmes conditions le lavage du précipité et du tube.

Le précipité est redissout dans 0,5 ml d'éthanol absolu et l'iode métalloïdique est titré au moyen d'une solution 0,01 N d'hyposulfite de sodium en présence d'empois d'amidon (microburette).

II. — DETERMINATION DES COEFFICIENTS D'ANALYSE.

Nous avons tout d'abord cherché à connaître la composition chimique des périodures de spermine et de spermidine en ce qui concerne la quantité d'iode métalloïdique combiné par molécule de bases précipitées. Pour cela nous avons réalisé les essais suivants :

Dans chaque tube d'une série de tubes à centrifuger coniques et de 50 ml de capacité, nous avons placé 30 ml de solution de chlorhydrate de spermine ou de chlorhydrate de spermidine apportant environ 0,2 mg de substance par ml. Nous avons ajouté à chaque prise d'essai 9 ml de réactif de KAHANE. Nous avons effectué les précipitations et les lavages des periodures cristallisés comme il a été dit précédemment.

Les concentrations exactes en chlorhydrates de bases des solutions ont été déterminées par les méthodes classiques : dosage de l'ion chlore par la méthode de CHARPENTIER et VOLHARD et dosage de l'azote organique par micro-Kjeldahl dans un appareil de PARNAS et WAGNER, selon les indications de NICLOUX, après minéralisation sulfurique en présence de catalyseur de DUMAZERT et MARCELET (56).

Les compositions théoriques des chlorhydrates de spermine et de spermidine sont les suivantes :

chlorhydrate de spermine (P.M. = 348)

chlore = 40,8 p. 100, soit 4 Eq Cl^- par mole
azote = 16,1 p. 100, soit 4 Eq N par mole

chlorhydrate de spermidine (P.M. = 254,5)

chlore = 41,8 p. 100, soit 3 Eq Cl^- par mole
azote = 16,5 p. 100, soit 3 Eq N par mole

Nous avons dosé dans les précipités de periodures l'iode métalloïdique titrable par l'hyposulfite et l'azote organique, après minéralisation, par micro-Kjeldahl.

Sur un essai, le précipité est redissous dans 1 ml d'éthanol absolu et l'iode titré par une solution 0,01 N d'hyposulfite en présence d'empois d'amidon.

Sur un deuxième essai, nous avons redissous le précipité dans l'éthanol. Cette solution est introduite ainsi que les liqueurs alcooliques de lavage, sans perte, dans un matras. Après minéralisation, l'azote est dosé par micro-Kjeldahl.

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau n° IV.

TABLEAU IV

Détermination de la teneur en iode métalloïdique des périodures de spermine et de spermidine. Etablissement du rapport : atome d'iode/mole de base du complexe.

	Spermine (en µ-Eq)	Spermidine (en µ-Eq)
Analyse de la prise d'essai (30 ml) :		
— pesée du chlorhydrate	0,575	0,780
— dosage de l'ion chlore	0,570	0,785
— dosage de l'azote	0,580	0,780
Moyenne	0,575	0,780
Analyse du précipité :		
— base (dosage de l'azote)	0,570	0,780
— iode	5,70	5,90
Rapport : atome d'iode/mole de base	10,0	7,54

L'examen des résultats contenus dans le tableau n° IV montre que :

— les déterminations effectuées sur les solutions utilisées pour l'analyse des periodures sont en parfait accord en ce qui concerne les dosages de l'azote, du chlore et les pesées des chlorhydrates. Ceci nous assure de la pureté des échantillons étudiés.

— le fait de retrouver intégralement l'azote mis en jeu dans les précipités apporte une première preuve de l'insolubilité des periodures de bases dans les conditions opératoires adoptées.

— aux erreurs expérimentales près, les périodures contiennent :

- pour une molécule de spermine : 10 atomes d'iode.
- pour une molécule de spermidine : 7,5 atomes d'iode.

Ces résultats sont en bon accord entre eux car on note que 2,5 atomes d'iode métalloïdique correspondent à un atome d'azote de chacune des polyamines.

Ces données nous permettent d'établir les coefficients d'analyse, à savoir : chaque ml de solution 0,01 N d'hyposulfite utilisé pour la détermination de l'iode des complexes correspond respectivement à :

— 0,348 mg de chlorhydrate de spermine ou 0,202 mg de la base,
— 0,339 mg de chlorhydrate de spermidine ou 0,193 mg de la base.

III. — VERIFICATION DE LA VALEUR DES COEFFICIENTS D'ANALYSE.

Afin de vérifier l'exactitude des coefficients établis et aussi de connaître les limites et les erreurs de la méthode, nous avons effectué la série d'essais suivants :

— Sur des prises d'essai de 5 ml de diverses solutions contenant des quantités connues de chlorhydrate de spermine et de chlorhydrate de spermidine, apportant environ 0,2 à 0,7 mg de substance, nous avons effectué la précipitation des bases sous forme de periodures et dosé l'iode métalloïdique dans chacun des précipités obtenus selon le protocole général décrit. Les volumes V ml de solution d'hyposulfite nécessités par les différents essais ont été convertis en quantité de bases correspondantes en utilisant les coefficients d'analyse que nous avons établis. Nous avons rassemblé dans le tableau n° V les résultats des dosages de spermine et de spermidine effectués par cette méthode en regard des quantités théoriques de substances apportées par les solutions mises en œuvre.

TABLEAU V

Dosage par notre méthode de la spermine et de la spermidine contenues dans des solutions de titres connus de chlorhydrates de bases.

Bases	Quantités théorique (en mg)	Quantité trouvées (en mg)	Erreur (en %)
Spermine	0,232	0,226	— 2,5
	0,464	0,465	0,0
	0,464	0,465	0,0
	0,504	0,501	— 0,6
	0,692	0,703	+ 1,6
	0,692	0,699	+ 1,0
Spermidine	0,233	0,234	0,0
	0,466	0,458	— 1,7
	0,466	0,460	— 1,3
	0,699	0,685	— 2,0
	0,699	0,685	— 2,0
	0,813	0,816	+ 0,3

L'examen des résultats contenus dans le tableau n° V montre que les coefficients d'analyse déterminés sont valables. L'ensemble de la méthode permet de doser la spermine et la spermidine en solutions apportant de 0,2 mg à 0,8 mg de substances avec une précision inférieure ou égale à $\pm$ 2 p. 100.

IV. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELS DES SOLUTIONS SUR LA PRECIPITATION DES POLYAMINES SOUS FORME DE PERIODURE.

Il a été montré, dans le cas de la précipitation de la choline sous forme de periodure, que des quantités notables de sels minéraux et en particulier de chlorure de sodium perturbent les dosages. Notre but était d'utiliser la méthode décrite pour le dosage des polyamines dans des effluents de colonne à chromatographie, riches en acide chlohydrique qu'il était nécessaire de neutraliser par des quantités équivalentes de soude. Nous avons recherché pour cette raison, dans quelles limites les concentrations en chlorure de sodium influaient sur le dosage.

Pour cela, nous avons préparé des solutions renfermant une quantité connue de base et diverses concentrations en chlorure de sodium. Sur 5 ml de ces diverses préparations, nous avons effectué les dosages des polyamines par précipitation sous forme de periodure. Nos résultats sont rassemblés dans le tableau n° VI.

TABLEAU VI

Influence de la concentration des liqueurs en chlorure de sodium sur la précipitation de la spermine et de la spermidine sous forme de periodures.

Concentration en NaCl		Spermine (en mg)	Spermidine (en mg)
(en mole/litre)	(en g/litre)		
0,00	0	0,382	0,280
0,90	52,7	—	0,283
0,98	57,3	—	0,282
1,05	61,4	—	0,277
1,13	66,1	—	0,276
1,20	70,2	—	0,283
1,46	85,4	0,384	—
1,50	87,8	—	0,283
1,58	92,4	0,384	—
1,69	98,9	0,380	—
1,80	105,3	0,380	—
2,25	131,6	0,656	0,674
3,00	175,5	8,080	6,60

De l'examen des résultats contenus dans le tableau n° VI il ressort que le chlorure de sodium n'a pas d'influence sur le dosage de la spermine pour des concentrations en ce sel inférieures ou égales à 1,80 mole par litre (soit 105,3 g par litre) et sur le dosage de la spermidine pour des concentrations inférieures à 1,50 moles par litre (soit 87,80 g par litre). Les résultats ne sont plus valables au-dessus de ces concentrations et sont même totalement aberrants pour une concentration de l'ordre de 175,5 g par litre en chlorure de sodium. Cette concentration aboutit au relargage d'une quantité importante d'iode contenu dans le réactif iodo-ioduré de KAHANE.

CHAPITRE DEUXIEME

PROCÉDÉ D'EXTRACTION DES BASES AMINÉES DE SOLUTIONS DILUÉES PAR LA MÉTHODE DITE DE « DOUBLE ÉCHANGE SIMULTANÉ »

Les polyamines sont présentes dans les milieux biologiques à de faibles concentrations et sont accompagnées d'une quantité considérable de substances — protidiques en particulier — constituant un ballast qu'il est indispensable d'éliminer. Tout procédé analytique doit comprendre deux étapes préliminaires qui sont d'une part, la déprotéinisation et, d'autre part, l'extraction des bases du filtrat. Pour être parfaitement satisfaisante, cette étape doit conduire à la fois à une nouvelle purification et à l'augmentation de la concentration de la liqueur en polyamines. Nous avons pensé effectuer cette opération en fixant les bases aminées sur des résines échangeuses d'ions. Des essais préliminaires nous ont montré que l'absorption des polyamines sur résine carboxylique disposée dans une colonne, nécessite une quantité importante de résine et entraîne, pour réaliser l'absorption et l'élution, des temps prohibitifs. Aussi avons-nous choisi d'effectuer cette étape d'une manière plus rapide et plus économique par agitation de la liqueur avec deux résines de charges opposées selon un procédé que nous proposons d'appeler pour cela : « *absorption par double échange simultané* » et que nous développerons maintenant.

I. — THEORIE DU FONCTIONNEMENT DES ECHANGEURS D'IONS.

Lorsque l'on met en suspension une résine échangeuse d'ions (R—H) en présence d'une solution d'un sel neutre (Cl-Na) l'échange entre les ions Na^+ et H^+ de la solution et de la résine est explicité par l'équation suivante :

$$R — H + Na — Cl \rightleftarrows R — Na + H — Cl$$

A l'équilibre on obtiendra par application de la loi d'action de masse :

$$\frac{[R — Na]\ [H — Cl]}{[R — H]\ [Na — Cl)]} = C$$

Les deux acides R — H et H — Cl ne sont pas dissociés d'une façon égale. Les équations d'équilibre sont :

$$\frac{[Cl^-]\ [H^+]}{[H - Cl]} = K_1$$

$$\frac{[R^-]\ [H^+]}{[H - R]} = K_2$$

K_1 et K_2 précisent respectivement la force de l'acide en solution (H — Cl) et la force de l'acidité de l'échangeur (H — R). Si l'on suppose que l'on met en contact une solution de Na-Cl apportant un Eq-g et une quantité de résine apportant également un Eq-g d'ions H^+ échangeable, le partage de l'ion Na^+ entre liquide et solide se fait de telle façon que *a* Eq-g du cation Na^+ se fixe sur la résine et que (1-*a*) Eq-g de cet ion reste en solution. Il s'ensuit qu'il restera en solution (1-*a*) Eq-g de NaCl et *a* Eq-g de H — Cl. Si l'on pose :

$$[R - Na] = S'' \text{ et } [R - H] = S'$$

on aura :

$$\frac{1 - a}{a} = \frac{1}{C} \cdot \frac{K_1}{K_2} \cdot \frac{S''}{S'}$$

et en posant :

$$\frac{K_1}{C.\ K_2} = Q$$

on obtiendra finalement :

$$\frac{1}{a} = 1 + Q\,\frac{S''}{S'}$$

Cette formule générale permet d'assimiler le coefficient de partage $\frac{a}{1 - a}$ entre ions en solution et ions se fixant sur l'échangeur au coefficient de partage d'un soluté entre deux solvants non miscibles d'après la loi de BERTHELOT-NERNST.

Il en résulte, au point de vue pratique, qu'à l'équilibre seule une partie des ions se fixe sur la résine. Nous avons réalisé certains essais afin de préciser expérimentalement la théorie. Nous avons opéré sur deux

résines : une résine anionique l'Amberlite IRA-401 (0,40-0,55 mm - pouvoir d'échange 1,1 mEq/g) et une résine cationique l'Amberlite IRC-50 (0,3 - 0,5 mm - pouvoir d'échange 2,16 mEq/g).

Nous avons placé dans un bécher de 250 ml de capacité 5 g de résine essorée et convenablement régénérée ainsi que 200 ml de solution de chlorure de sodium. La résine est maintenue en suspension à l'aide d'un agitateur magnétique. Les essais ont été effectués en maintenant le contact pendant 30 minutes, temps le plus généralement adopté comme permettant d'atteindre l'équilibre dans un rapport au moins égal à 95 p. 100 (Austerweil, 11). Au bout de ce temps, nous avons essoré la résine et l'avons lavée avec 2 fois 10 ml d'eau distillée. Nous avons rassemblé les liqueurs et nous avons porté celles-ci à un volume connu. Nous avons dosé les ions chlorures par la méthode de Charpentier-Volhard et les ions sodium par spectrophotométrie de flamme.

Les résultats portant sur les deux résines et sur des solutions de chlorure de sodium de concentrations différentes sont rassemblés dans les tableaux numéros VII et VIII.

TABLEAU VII

Fixation (mEq par g de résine) de l'ion chlorure par l'Amberlite IRA-401 (0,40 - 0,55 mm - capacité d'échange : 1,1 mEq par g).

Solution de ClNa (en g ‰)	Ions Cl— fixés (en mEq/g)	Rapport du nombre d'ions fixés au nombre d'ions mis en jeu (en %)
1	0,20	33,3
2,75	0,40	21,2
5,62	0,64	16,6
11,82	0,68	8,4
17,70	0,74	6,1
23,00	0,80	5,0

TABLEAU VIII

Fixation (mEq par g de résine) de l'ion sodium par l'Amberlite IRC-50 (0,3 - 0,5 mm - capacité d'échange : 2,16 mEq par g).

Solution de ClNa (en g ‰)	Ions Na+ fixés (en mEq/g)	Rapport du nombre d'ions fixés au nombre d'ions mis en jeu (en %)
2,8	0.06	3,1
5,8	0,26	6,5
15,8	0,60	5,5
22,8	0,86	5,4

De l'examen des résultats contenus dans les tableaux VII et VIII il ressort que la quantité d'ions fixée par les résines dépend de la concentration en chlorure de sodium de la solution mise en jeu. Dans le cas le plus favorable, en mettant en jeu de 8 à 10 fois plus d'ions que la

quantité correspondant à la capacité totale d'échange de la résine, l'Amberlite IRC-50 n'est susceptible d'échanger que 39 p. 100 de ses ions H^+ et l'Amberlite IRA-401, 72,7 p. 100 de ses ions $(HO)^-$. Ces résultats sont en bon accord avec les considérations théoriques que nous avons développées.

II. — TECHNIQUE D'ABSORPTION PAR « DOUBLE ECHANGE SIMULTANE ».

Le dispositif que nous avons utilisé est schématisé dans la figure n° 6.

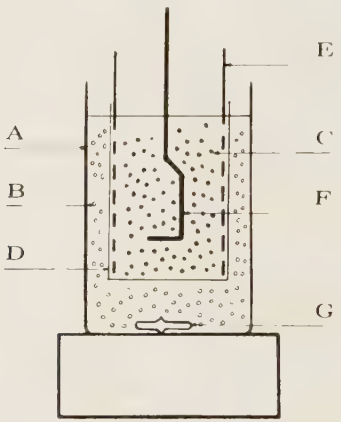


Figure n° 6. — *Dispositif pour l'absorption par « double échange simultané ». A : bécher, B : résine carboxylique, C : résine anionique, D : manchon de toile, E : cylindre de matière plastique perforé, F et G : agitateurs.*

On place dans un bécher de forte haute (A) un poids P de résine carboxylique (B). On introduit un poids 2P de résine anionique (C) dans un manchon de toile (D) ajusté sur un cylindre perforé (E). On verse dans le récipient une solution neutre de sel et on immerge le sac. La liqueur se répartit dans les deux compartiments. On maintient les résines en suspension par agitation.

La résine carboxylique fixe les ions alcalins tandis que la résine anionique absorbe les ions de caractère acide. Les quantités de résine mises en jeu sont choisies de telle sorte qu'elles apportent le même nombre d'ions échangeables et de signes opposés.

Dans une première série d'expériences portant sur des solutions de chlorure de sodium, nous avons opéré avec 5 g d'Amberlite IRC-50 (capacité totale d'échange : 10,8 mEq) et 10 g d'Amberlite IRA-401 (capacité totale d'échange : 11 mEq) et 200 ml de solution de chlorure de sodium à diverses concentrations. Après une demi-heure de contact les résines sont

essorées et lavées. Sur les liqueurs traitées nous avons dosé les ions chlorure et sodium. Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau n° IX.

TABLEAU IX

Absorption des ions chlorure et sodium sur Amberlite IRC-50 et Amberlite IRA-401 par la technique d'absorption par double échange simultané.

Solution de ClNa (en g ‰)	Ions Cl⁻ ou Na+ mis en jeu (en mEq)	Ions absorbés (en mEq)	
		Cl⁻	Na+
4,22	14,4	8,0	8,0
2,93	10,0	9,0	9,1
1,14	4,88	4,88	4,88
1,20	1,63	1,63	1,63

De l'examen des résultats contenus dans le tableau IX il ressort que lorsque l'on met en œuvre des solutions de chlorure de sodium apportant une quantité d'ions de polarités différentes supérieure aux quantités de fixation optima d'échange des résines, celles-ci fixent une quantité d'ions voisine de leur capacité totale d'échange (90 p. 100 environ). Par contre, lorsque la quantité d'ions apportée par la liqueur est inférieure à cette valeur la solution récupérée en fin d'expérience est parfaitement désionisée. Ceci s'explique par le fait qu'au cours de l'opération les absorptions s'effectuent en milieu neutre et qu'il n'apparaît jamais d'excès d'ions H^+ et $(HO)^-$ qui concourent à la formation d'équilibre. Celui-ci est toujours détruit et les résines fixent dans la limite de leur capacité optimum d'échange, tous les ions qui leur sont offerts.

III. — APPLICATION DE LA TECHNIQUE D'ABSORPTION PAR DOUBLE ECHANGE SIMULTANE A LA RECUPERATION DE COMPOSES BIOLOGIQUES DE CARACTERE BASIQUE EN SOLUTIONS DILUEES.

Nous avons étudié le procédé que nous venons de décrire dans le cas de l'absorption de divers composés d'origine biologique, à savoir : la spermine, la spermidine, la choline, l'arginine, l'histidine et la lysine.

A) **Spermine** et **Spermidine.**

Nous avons traité par un gramme d'Amberlite IRC-50 (capacité d'échange = 2,16 mEq) et 2 g d'Amberlite IRA-401 (capacité d'échange = 2,2 mEq) des solutions apportant dans 50 ml soit 50 mg de chlorhydrate de spermine (0,574 mEq Cl^-), soit 48,5 mg de chlorhydrate de spermidine (0,408 mEq Cl^-). Au cours de l'absorption par double échange simultané nous avons suivi, en fonction du temps, la disparition des polyamines de la liqueur par la méthode précédemment décrite (voir p. 57). Le tableau n° X contient les résultats de ces expériences.

TABLEAU X

Absorption par double échange simultané de la spermine A et de la spermidine en fonction du temps

Temps de contact (en minutes)	Spermine en solution (mg)	Spermidine en solution (mg)
0	29,95	30,88
15	1,44	1,34
30	0,35	0,29
45	0,06	0,13
60	0,00	0,00

L'examen des résultats contenus dans le tableau n° X montre qu'en une heure, la spermine et la spermidine sont absorbées par la résine carboxylique.

B) **Choline.**

Nous avons disposé d'une solution contenant 2,38 g de chlorhydrate de choline (HCl, choline = 139,5) par litre. Une prise d'essai de 250 ml de cette liqueur, qui apporte 0,595 mg de sel (soit 0,442 g de base ou 4,26 mEq Cl^-), est traitée à la fois par 10 g d'Amberlite IRA-401 (capacité d'échange : 11 mEq) et 5 g d'Amberlite IRC-50 (capacité d'échange : 10,9 mEq). Le dosage de la choline dans la solution a été effectué par la méthode de KAHANE et DUCET (44). Nous avons suivi en fonction du temps la disparition de la base dans la solution. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau n° XI.

TABLEAU XI

Absorption par double échange simultané de la choline en fonction du temps

Temps de contact (en minutes)	Ions choline restant en solution	
	en mg	en % de la quantité initiale
0	442	100
15	254	55
30	214	48
45	167	37
60	135	28
75	113	25
135	41	9

De l'examen des résultats contenus dans le tableau XI il ressort que 90 p. 100 de la choline mise en jeu est absorbée par la résine carboxylique en environ deux heures.

C) **Arginine, Histidine** et **Lysine.**

Afin d'étudier l'absorption des bases hexoniques nous avons disposé de 250 ml de chacune des trois solutions suivantes :

— solution à 4,41 g de chlorhydrate d'arginine (HCl, arginine = 210,5) par litre, apportant dans la prise d'essai 0,873 g d'amino-acide, soit 5 mEq d'ion Cl^-.

— solution à 4,192 g de chlorhydrate d'histidine (HCl, histidine = 209,6) par litre, apportant dans la prise d'essai 0,775 g d'amino-acide, soit 5 mEq d'ion Cl^-.

— solution à 2,191 g de bichlorhydrate de lysine ($_2$HCl, lysine = 219,2) par litre apportant dans la prise d'essai 0,274 g d'amino-acide, soit 5 mEq d'ion Cl^-.

Ces différentes liqueurs ont été maintenues en contact avec 10 g d'Amberlite IRA-401 (capacité d'échange : 11 mEq) et 5 g d'Amberlite IRC-50 (capacité d'échange : 10,8 mEq). Nous avons suivi en fonction du temps, la disparition des amino-acides des solutions. L'arginine a été dosée par la méthode de Dumazert et Poggi (57), l'histidine par la méthode de Mac Pherson (111) et la lysine par la technique de Dumazert, Ghiglione et Dinh Van Hoang (54). Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau n° XII.

TABLEAU XII

Fixation des amino-acides basiques par la technique d'absorption par double échange simultané

Amino-acide	Temps de prélèvement en min.	Amino-acide restant en solution	
		en mg	en % de la quantité initiale
Arginine	0	873	100
	15	435	52
	30	310	35
	45	156	18
	60	0	0
Histidine	0	775	100
	15	430	55
	30	424	55
	45	295	38
	60	295	38
Lysine	0	274	100
	15	117	43
	30	84	31
	45	80	29
	60	77	28

L'examen des résultats contenus dans le tableau XII montre qu'aux erreurs expérimentales près, seule l'arginine disparaît totalement de la solution dans les conditions opératoires choisies. Par contre, l'histidine et la lysine ne sont que partiellement éliminées de la solution puisqu'il reste encore en solution respectivement 38 et 28 p. 100 de la quantité d'amino-acides initialement mise en œuvre.

IV. — RECUPERATION DES COMPOSES ORGANIQUES BASIQUES FIXES SUR LES RESINES AU COURS DE L'ABSORPTION PAR DOUBLE ECHANGE SIMULTANE.

A la suite des expériences précédentes, nous avons recherché s'il était possible de récupérer quantitativement par élution les bases fixées sur la résine carboxylique d'une part, et d'autre part, de préciser dans le cas de l'absorption des composés amphotères tels que les amino-acides, s'il n'y avait pas une répartition de ces composés à la fois sur les deux résines de caractères opposés.

A) Récupération de la choline, de la spermidine et de la spermine fixées sur la résine cationique.

Après avoir fixé les bases présentes en solution au moyen de la technique d'absorption par double échange simultané et dans les conditions identiques à celles qui viennent d'être décrites précédemment, nous avons récupéré quantitativement la résine cationique. Celle-ci est placée dans une colonne de verre de 10 mm de diamètre et de 30 cm de hauteur. Nous avons élué les bases en admettant sur la colonne 100 ml de solution 2N d'acide chlorhydrique (débit 1 ml/mn). Les effluents ont été neutralisés par un volume convenable de solution 2N de soude et les liqueurs portées à volume connu.

Dans chaque essai portant sur une quantité connue d'une base déterminée, nous avons dosé dans l'éluat celle-ci au moyen d'une technique appropriée. Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau n° XIII.

TABLEAU XIII

Quantités de bases fixées sur la résine carboxylique (en p. 100 de la quantité initialement mise en jeu)

Substance	Quantité récupérée (en % de la quantité mise en œuvre)
Choline	95
Spermine	98
Spermidine	95

L'examen des résultats contenus dans le tableau XIII montre qu'aux erreurs expérimentales près, les bases azotées se fixent quantitativement sur la résine carboxylique par la technique d'absorption par double échange simultané et que l'on peut récupérer la choline et les polyamines absorbées par élution avec un rendement excellent.

B) Répartition des amino-acides bibasiques sur la résine anionique et cationique au cours de l'absorption par double échange simultané.

Nous avons opéré dans chaque cas sur 5 g d'Amberlite IRC-50 et 10 g d'Amberlite IRA-401. Nous avons mis en œuvre 250 ml de solution contenant 10 mg de chlorhydrate d'amino-acide. L'absorption est effectuée en 3 heures de contact entre les liqueurs et les résines échangeuses d'ions. Au bout de ce temps, les résines ont été récupérées séparément. Celles-ci ont été lavées avec 25 ml d'eau distillée. Les liqueurs traitées, ainsi que les eaux de lavage, sont rassemblées et concentrées sous vide à cessité. Le résidu est dissous dans 50 ml d'eau distillée. Chaque résine est déposée dans une colonne de verre de 10 mm de diamètre. Nous avons élué les composés qui s'y sont trouvés fixés. En ce qui concerne la résine carboxylique, celle-ci a été traitée par 75 ml de solution 2N d'acide chlorhydrique (débit 1 ml/mn) puis lavée par 50 ml d'eau distillée. Les effluents sont neutralisés par des quantités convenables de solution 2N de soude et les liqueurs portées à volume connu. Les composés fixés par la résine anionique ont été élués par 75 ml de solution 3N de soude. La résine a été lavée et l'effluent neutralisé et porté à volume connu comme précédemment.

Pour chaque essai relatif à un amino-acide déterminé, nous avons dosé celui-ci par une technique convenable (voir p. 69) dans les trois liqueurs obtenues, à savoir :

— la liqueur traitée contenant l'amino-acide non absorbé,
— la liqueur d'élution de la résine anionique,
— la liqueur d'élution de la résine cationique.

Les résultats de ces dosages sont rassemblés dans le tableau n° XIV.

TABLEAU XIV

Quantité d'amino-acide (en % de la quantité initialement mise en jeu) non absorbée (A), fixée sur la résine cationique (B) et sur la résine anionique (C).

Amino-acide	Quantité d'amino-acide (%)			
	non absorbée (A)	fixée sur A-IRC-50 (B)	fixée sur A-IRA-401 (C)	Bilan A+B+C
Arginine	3,0	95,0	0,0	98
Histidine	0,5	12,2	82,0	94,7
Lysine	1,5	45,0	53,5	100

L'examen des résultats contenus dans le tableau XIV montre qu'aux erreurs expérimentales près, nous pouvons établir un bilan des quantités d'acides diaminés respectivement présentes dans la liqueur traitée et fixées sur les résines anioniques et cationiques. Seules de très faibles quantités d'amino-acides ne sont pas absorbées sur l'une ou l'autre des résines. Sauf en ce qui concerne l'arginine, les amino-acides se fixent à la fois sur les deux types de résines échangeuses d'ions. Nous avons rassemblé dans le tableau n° XV les valeurs correspondant d'une part, au point isoélectrique de ces amino-acides, et d'autre part, le rapport des quantités de composés fixées sur la résine carboxylique (B) à celles des quantités de composés fixées sur la résine anionique (C).

TABLEAU XV

Comparaison des valeurs des points isoélectriques des acides diaminés et du rapport de fixation de ceux-ci sur les deux résines de signes opposés (B/C).

Amino-acide	Pi	B/C
Arginine	10,76	+ ∞
Lysine	9,47	0,84
Histidine	7,64	0,15

L'examen des résultats contenus dans le tableau XV montre que les amino-acides se répartissent sur les deux résines en fonction de leur point isoélectrique. Plus la valeur du point isoélectrique est faible, plus l'amino-acide se fixe proportionnellement sur la résine anionique. Par contre, lorsque la valeur du point isoélectrique est supérieure à 10 environ, l'amino-acide se fixe sur la résine carboxylique.

CHAPITRE TROISIEME

CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'IONS (Dowex) DE LA SPERMINE DE LA SPERMIDINE ET DE DIVERS CATIONOIDES

Bien que la spermine et la spermidine puissent être dosées par des procédés rapides tels que l'ionophorèse sur papier, il n'en demeure pas moins que la chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions, suivie de détermination quantitative portant sur les diverses fractions de l'effluent, constitue à l'heure actuelle la méthode analytique de choix. Nous décrirons dans ce chapitre l'ensemble des techniques que nous avons utilisées portant, d'une part, sur le procédé chromatographique et d'autre part, sur les méthodes choisies dans le but de doser certains cationoïdes, à savoir la spermine, la spermidine, la choline et l'arginine ainsi que les ions ammonium, sodium et potassium.

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

Nous avons adapté à notre travail la technique proposée par Tabor, Rosenthal et Tabor (186). Le principe consiste à absorber les bases sur une colonne de Dowex 50-X-2 (200-400 mesh), résine sulfonique et à les chromatographier en admettant sur la résine une solution de concentration régulièrement croissante en acide chlorhydrique (chromatographie par gradient de concentration). La présence de quantités importantes d'ions chlorure dans la liqueur à chromatographier nous a amené à effectuer le chargement de la colonne après passage de la solution sur une résine anionique afin d'éliminer les ions chlorure ; ceci conduit accessoirement à éliminer les amino-acides autres que l'arginine.

Nous présentons dans la figure n° 7 les schémas du dispositif que nous utilisons.

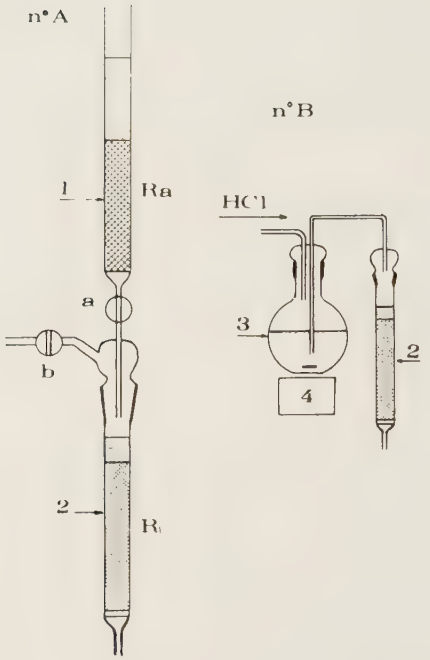


Figure n° 7. — *Dispositif pour la chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions.*

N° A - 1 : *Colonne de résine anionique (Ra). 2 : colonne à chromatographier de résine cationique (Rc) - a et b : robinets.*

N° B - 2 : *Colonne à chromatographier de résine cationique - 3 : Ballon mélangeur - 4 : Agitateur.*

Le schéma n° A de la figure n° 7 représente le dispositif utilisé lors du chargement de la colonne par la prise d'essai qui précède la chromatographie proprement dite. La première colonne (1) a un diamètre intérieur de 10 mm et 20 cm de long dont 10 cm sont occupés par la résine anionique (Amberlite IRA-401). Cette résine à groupements fonctionnels ammonium quaternaire est activée, au préalable, par passage de solution 2N de soude suivi d'un lavage à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent.

Par l'intermédiaire du robinet (a), la colonne (1) s'adapte sur la colonne à chromatographier (2) au moyen d'un bouchon rodé creux muni d'un robinet latéral (b). La colonne (2) a un diamètre de 10 mm pour une longueur de 12 cm dont 8 cm sont occupés par la résine cationique activée (Dowex 50-X-2, qualité analytique 200-400 mesh) régénérée par traitement à l'acide chlorhydrique 5N suivi d'un lavage abondant à l'eau distillée de manière à ce que l'effluent ait un pH = 7.

La solution contenant les chlorhydrates des bases (soit environ 20 ml) est introduite à la partie supérieure de la colonne (1). La liqueur traverse la colonne anionique et y abandonne les ions chlorures et les amino-acides autres que l'arginine. La solution alcaline passe automatiquement sur la colonne (2) qui fixe à son sommet les cationoïdes. Le robinet (a) permet de régler à 0,5 ml par minute le débit de l'hydrolysat traversant le dispositif. Lorsque toute la prise d'essai est passée sur la colonne (1), on lave celle-ci à l'aide de 30 ml d'eau distillée, cette liqueur de lavage passant également sur la résine contenue dans la colonne (2). Cette opération terminée, on retire la colonne (1) et on connecte la colonne (2) au dispositif d'alimentation de l'éluant. Le schéma n° B de la figure n° 7 représente le dispositif de la chromatographie proprement dite ; la colonne (2) est adaptée au ballon mélangeur (3) de 500 ml de capacité, qui contient au départ 300 ml d'eau distillée. On y fait arriver à débit constant (soit 27 ml/mn) une solution 3N d'acide chlorhydrique en agitant constamment (4). L'éluat est recueilli par fractions de 9 ml toutes les 20 minutes.

II. — ANALYSE DE L'EFFLUENT.

Dans une première étape, nous avons étudié le comportement des divers cationoïdes précédemment cités. Ces composés sont identifiés et dosés sur des parties convenables des différentes fractions de l'effluent recueilli par un ensemble de méthodes que nous allons décrire.

En ce qui concerne le sodium et le potassium, ces deux métaux ont été identifiés et dosés par spectrophotométrie de flamme. L'ammoniaque a été recherchée et dosée après entraînement par la vapeur dans un appareil de Parnas et Wagner selon Nicloux.

La spermine, la spermidine et la choline présentent un ensemble de caractères analytiques communs. Elles donnent des composés insolubles et colorés avec le réactif de Dragendorf et sont dosées par précipitation à l'état de periodure (voir p. 57). A l'exception de la choline, tous les composés organiques azotés étudiés, ainsi que l'ammoniaque, donnent une réaction colorée avec la ninhydrine. Afin d'effectuer des déterminations quantitatives, nous avons adopté la méthode préconisée par Moore et Stein (124). Comme nous l'avons signalé, cette méthode n'est pas particulièrement satisfaisante en ce qui concerne le dosage des diamines (putrescine et cadavérine) ; néanmoins elle permet d'apprécier la teneur des effluents en ces bases avec une précision suffisante pour étudier leur comportement chromatographique. Nous avons dosé et identifié l'arginine par la méthode colorimétrique de Sakaguchi selon la technique de Dumazert et Poggi (57).

Tous les composés organiques ont été, en outre, identifiés par ionophorèse sur papier.

A) **Recherche et identification des composés organiques basiques par ionophorèse.**

a) *Conditions opératoires.*

L'ionophorèse est réalisée sur papier Whatman n° 1 en utilisant le tampon préconisé par FISCHER et BOHN (65, 66). Il est constitué d'une solution 0,03 N d'acide citrique (6,3 g par litre) ajustée à pH = 6,5 (électrode de verre) par addition d'un volume convenable (environ 40 ml) de solution 2N de soude. La tension adoptée est de 300 volts et l'ampérage de 1 mA/cm. La durée des ionophorèses est de 4 heures pour la recherche et l'identification de la spermine, de la spermidine, de la putrescine et de la cadavérine. En ce qui concerne l'identification de la choline, une heure représente un temps de migration convenable pour cette base.

La figure n° 8 contient les schémas de deux ionophorèses montrant les migrations respectives de ces composés dans les conditions opératoires ci-dessus mentionnées.

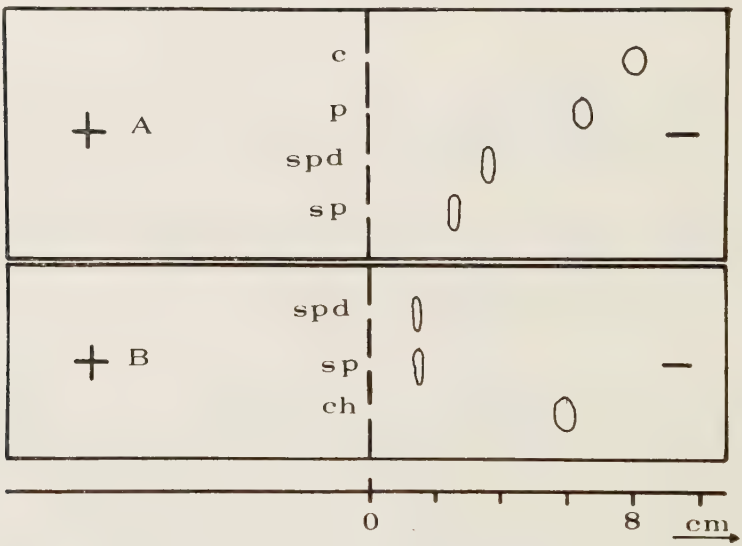


Figure n° 8. — *Schémas d'ionophorégrammes de la spermine (Sp), de la spermidine (Spd), de la cadavérine (C), de la putrescine (P) et de la choline (Ch.). (Tampon : acide citrique-citrate de sodium - pH = 6,3) (300 V. - 1 mA/cm). Schéma A = 4 heures. Schéma B = 1 heure.*

L'examen des schémas présentés dans la figure n° 8 montre que les comportements ionophorétiques des bases sont suffisamment différents pour permettre l'identification de ces composés. Les quantités de substance mises en œuvre et déposées sur l'ionophorégramme sont comprises entre 2 et 10 µg.

b) *Réactions colorées d'identification des composés séparés par ionophorèse.*

Nous avons mis en œuvre deux techniques de révélation. La première utilise le réactif de DRAGENDORF et permet de repérer la présence de la spermine, de la spermidine et de la choline. La seconde nécessite un réactif à la ninhydrine et permet de révéler tous les composés azotés étudiés sauf la choline.

1. Révélation par le réactif de DRAGENDORF :

Nous avons opéré selon le procédé préconisé par FRANÇOIS et SEGUIN (67). Le réactif nécessaire à la composition suivante :

On prépare tout d'abord la solution composée de :

— carbonate de bismuth	5 g
— iodure de potassium	20 g
— acide HCl (d = 1,18)	10 ml
— eau distillée q. s. p.	100 ml

On dilue l'acide chlorhydrique dans 50 ml d'eau, on fait dissoudre dans cette liqueur le carbonate de bismuth. On ajoute alors l'iodure de potassium et on porte le volume à 100 ml au moyen d'eau distillée. Cette solution se conserve au maximum pendant un mois en flacon coloré et soigneusement bouché.

Au moment de l'emploi la solution est diluée au $1/25^{e}$ avec une solution 0,1 N d'acide chlorhydrique. Les spots de l'ionophorégramme sont révélés en plongeant le document préalablement séché dans le réactif. La spermine apparaît sous forme d'une tache rouge orangé, la spermidine présente une coloration rouge violet et la choline apparaît en violet à reflet mordoré. Le document présente une coloration de fond jaune.

2. Révélation par le réactif à la ninhydrine :

Nous avons utilisé une solution 0,1 p. 100 de ninhydrine dans l'acétone. L'ionophorégramme sec est immergé dans cette liqueur. On laisse ensuite évaporer le solvant d'imprégnation dans un courant d'air, puis on porte le document quelques minutes à l'étuve à 100°. Tous les composés, sauf la choline, paraissent en gris-bleu sur fond blanc.

B) **Recherche des composés ninhydrine-positifs et dosage de la cadavérine et de la putrescine dans l'effluent des séparations chromatographiques.**

Cette méthode nécessite un réactif préparé en faisant dissoudre 2 g de ninhydrine dans 25 ml d'un tampon acéto-acétique (pH = 5,5) obtenu lui-même en faisant dissoudre 272 g d'acétate de sodium (C_2H_3OONa,

3 H_2O) dans 200 ml d'eau distillée, puis en ajoutant 50 ml d'acide acétique glacial et en portant le volume de la préparation à 500 ml. On ajoute alors aux 25 ml de solution acétique de ninhydrine 75 ml de méthylcellosolve.

On effectue des prélèvements de 0,5 ml des différentes fractions de l'effluent. On neutralise chacun des prélèvements par des quantités convenables de solution 3N de soude. On porte les volumes à un ml au moyen d'eau distillée, puis on ajoute à chaque essai un ml de réactif à la ninhydrine. Après avoir homogénéisé, on porte les solutions au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Au bout de ce temps on refroidit et on dilue chaque essai par 2 ml d'alcool à 50°. On prépare, dans les mêmes conditions, un essai témoin en substituant à la prise d'essai un ml d'eau distillée. On détermine l'intensité de l'absorption des colorations obtenues sous une épaisseur de 10 mm et pour une longueur d'onde de 525 mμ.

Les déterminations relatives à la cadavérine et à la putrescine sont réalisées en se rapportant à des courbes d'étalonnage obtenues par la mesure des intensités d'absorption de solutions apportant des quantités connues de diamines. Dans les autres cas, les résultats sont exprimés en unités arbitraires (D.O. rapportée à une détermination hypothétique qui serait effectuée sur la totalité du volume d'une fraction).

C) **Dosages de la spermine, de la spermidine et de la choline.**

Ces cationoïdes ont été dosés au moyen du procédé déjà décrit, basé sur la précipitation de ces composés sous forme de periodure. Le mode opératoire suivant a été adopté :

On mesure dans chaque tube d'une série de tubes à centrifuger cylindro-coniques de 15 ml de capacité 5 ml des différentes fractions de l'effluent dans lesquelles on a identifié par les techniques que nous venons de décrire la choline, la spermine et la spermidine. Chaque essai est neutralisé par un volume convenable de solution 5 N de soude. Les quantités de cette solution nécessaires aux neutralisations des fractions d'effluents sont calculées au moyen de la courbe de gradient de concentration en acide chlorhydrique (figure n° 9 - diagramme D n° 1). Le volume final de chaque essai est porté à 7 ml avec de l'eau distillée. On ajoute, tout en agitant, 2,1 ml de réactif de KAHANE (voir p. 57). On abandonne les essais deux heures au réfrigérateur à + 4°. Au bout de ce temps on centrifuge, on aspire les liqueurs surnageantes et on lave les parois internes de chaque tube à l'aide de 2 fois 5 ml d'eau glacée, en prenant soin de ne pas remettre les précipités en suspension. On centrifuge à nouveau et on redissout les précipités dans 0,5 ml d'éthanol. On détermine la teneur en iode métalloïdique à l'aide d'une solution 0,01 N d'hyposulfite de sodium en présence d'empois d'amidon.

Dans ces conditions, un ml de solution 0,01 N d'hyposulfite correspond à 0,202 mg de spermine ou 0,193 mg de spermidine ou enfin 0,130 mg de choline.

III. — RESULTATS.

Nous présentons dans la figure n° 9 les diagrammes des chromatogrammes obtenus. Le premier diagramme (D. n° 1) correspond aux variations d'acidité des fractions de l'éluat. Le second (D. n° 2) illustre la séparation d'un mélange d'ions potassium, de choline, d'arginine, de spermine et de spermidine. Le troisième (D. n° 3) montre le résultat de la séparation des ions sodium et potassium, de la putrescine et de la cadavérine.

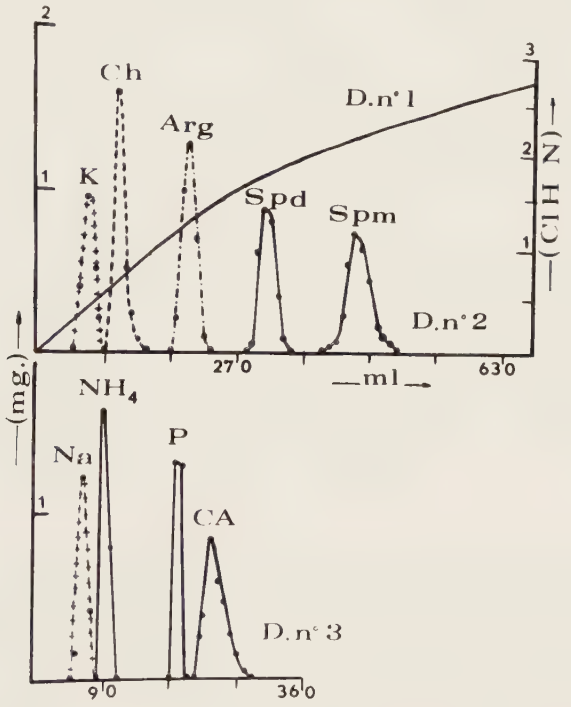


Figure n° 9. — *Chromatographie sur Dowex 50-X-2 de divers cationoïdes et ions minéraux.*

D. n° 1 : *gradient d'acidité de l'effluent.*

D. n° 2 : *chromatographie d'un mélange de potassium (K = 2 mg), de choline (Ch = 4 mg), d'arginine (Arg = 3,3 mg), de spermidine (Spd = 2,8 mg) et de spermine (Spm = 2,4 mg).*

D. n° 3 : *chromatographie d'un mélange de sodium (Na = 1,7 mg), d'ammonium (NH_4 = 2,4 mg), de putrescine (P = 2,6 mg) et de cadavérine (Ca = 2,4 mg).*

L'examen des graphiques contenus dans la figure n° 9 montre que les mélanges analysés sont parfaitement résolus. En particulier, la spermine et la spermidine sont isolées l'une de l'autre et d'avec les autres consti-

tuants. Il n'est pas possible de séparer la putrescine, la cadavérine et l'arginine. On notera également que les ions potassium d'une part, l'ammonium et la choline d'autre part, possèdent des volumes de rétention trop voisins pour qu'il soit possible de les obtenir dans des fractions séparées. Néanmoins, sauf en ce qui concerne la putrescine et la cadavérine, tous les autres composés peuvent être facilement dosés soit par des méthodes spécifiques qui ne sont pas perturbées par la présence de composés les accompagnant, soit par des méthodes de groupe : dans ce cas les substances se trouvent suffisamment séparées pour que les déterminations n'interfèrent pas les unes avec les autres.

Afin d'éprouver sur le plan quantitatif la validité de la technique, nous avons effectué des déterminations portant sur la séparation chromatographique de quantités connues de spermine et de spermidine suivie du dosage de ces bases dans les effluents par le procédé proposé. Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau n° XVI.

TABLEAU XVI

Dosages de la spermidine et de la spermine après séparations chromatographiques de quantités connues de polyamines.

Essai n°	Spermine (mg)		Spermidine (mg)	
	mis en jeu	trouvé	mis en jeu	trouvé
1	2,05	2,15	2,89	2,87
2	2,48	2,54	2,54	2,52
3	2,90	2,91	2,83	2,76

L'examen des résultats contenus dans le tableau XVI montre qu'aux erreurs expérimentales près, la spermine et la spermidine sont intégralement retrouvées dans les effluents résultant de la séparation chromatographique de ces substances.

DEUXIEME PARTIE

DOSAGE DES CATIONOIDES DANS LES TISSUS D'ANIMAUX NORMAUX ET INANITIÉS

La détermination de la teneur en spermine, en spermidine et en divers cationoïdes des tissus animaux nécessite différentes étapes. Nous décrirons, dans un premier chapitre, l'ensemble de la technique que nous avons mise au point ainsi que les résultats auxquels elle nous a conduit en l'appliquant à l'analyse d'organes de bœuf, de rat et de lapin.

Dans un deuxième chapitre, nous avons rassemblé les données expérimentales que nous avons recueillies sur les variations de la teneur en cationoïdes de tissus de rat au cours d'essais portant sur l'inanition protéique de cet animal. Enfin, dans un troisième chapitre, nous exposerons les résultats obtenus sur les modifications de la teneur en cationoïdes des organes du rat et du lapin lorsqu'ils sont soumis à l'intoxication par la phénylhydrazine.

CHAPITRE PREMIER

TENEUR EN CATIONOIDES DES TISSUS D'ANIMAUX NORMAUX

A la suite du travail préliminaire présenté dans la première partie de notre Thèse, nous sommes en mesure de proposer une méthode générale de dosage de divers cationoïdes dans les tissus animaux comportant cinq étapes principales, à savoir :

1° la déprotéinisation des homogénats tissulaires,

2° l'application de la technique d'absorption par double échange simultané au filtrat de déprotéinisation,

3° l'hydrolyse chlorhydrique de l'éluat qui nous est apparue comme indispensable pour obtenir une liqueur convenable afin d'effectuer les séparations chromatographiques.

4° la chromatographie de l'hydrolysat sur résine sulfonique.

5° l'analyse des fraction recueillies à la suite de cette séparation.

I. — DEPROTEINISATION DES HOMOGENATS TISSULAIRES.

Le tissu est finement broyé dans deux fois son poids d'eau distillée (microbroyeur BULHER). L'homogénat obtenu est acidifié par addition d'acide acétique jusqu'à ce que le pH ait atteint une valeur comprise entre 4 et 5 (électrode de verre). Il est alors porté au bain-marie réglé à 80° pendant une demi-heure sous agitation mécanique. Après refroidissement, on élimine le coagulum par centrifugation (20.000 g) et le culot est lavé à deux reprises par de l'eau distillée. Les solutions aqueuses réunies sont portées à volume connu (10 ml de liqueur par gramme de tissu frais).

II. — ABSORPTION DES CATIONOIDES PAR DOUBLE ECHANGE SIMULTANE.

Nous utilisons le dispositif décrit p. 66. La liqueur obtenue précédemment est transvasée dans un bécher contenant un poids P g de résine carboxylique (IRC-50) égal au 1/3 du poids de tissu frais mis en œuvre.

On immerge alors le sac contenant la résine cationique (IRA-401). La quantité de cette dernière correspond au double du poids de la résine carboxylique utilisée. Les résines sont mises en suspension par agitation mécanique pendant deux heures. On vérifie alors que la liqueur ne contient pratiquement plus d'ions sodium et potassium, ce qui indique l'absorption totale des cationoïdes.

La résine carboxylique est récupérée et lavée à deux reprises par 20 ml d'eau distillée. Après l'avoir essorée, elle est mise en suspension dans une solution 6N d'acide chlorhydrique, le volume de cette solution étant égal au double du poids de la résine carboxylique mis en œuvre. On maintient la suspension par agitation mécanique pendant une demi-heure. On récupère la liqueur acide et on renouvelle deux fois l'élution dans les mêmes conditions. Nous avons vérifié que ce procédé d'élution donne les mêmes résultats que celui consistant à opérer en colonne au moyen de solutions acides plus diluées. Ces conditions présentent en outre l'avantage de disposer d'une solution suffisamment concentrée en acide pour pouvoir être soumise directement à l'opération suivante.

Les liqueurs acides sont rassemblées après essorage convenable de la résine.

III. — **HYDROLYSE.**

La solution d'élution est portée à ébullition sous réfrigérant à reflux, pendant 18 heures. Elle est ensuite refroidie et évaporée jusqu'à cessité sous vide. Le résidu est repris quatre fois par 10 ml d'eau distillée, opération suivie chaque fois d'une évaporation à cessité, afin d'éliminer l'excès d'acide chlorhydrique. Le résidu est enfin dissous par 25 ml d'eau distillée.

Nous avons vérifié qu'au cours de l'hydrolyse il ne se produit aucune perte en spermine et en spermidine. Pour cela, nous avons traité dans les conditions qui viennent d'être précisées des prises d'essai de 250 mg de caséine (HARMMASTEIN) additionnées de quantités connues de spermine et de spermidine. Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau n° XVII.

TABLEAU XVII

Vérification de la stabilité de la spermidine et de la spermine au cours de l'hydrolyse chlorhydrique de la caséine (HCl 6 N, 18 heures, 100° C).

Spermine $(ClH)_4$ (en mg)		Spermidine $(ClH)_3$ (en mg)	
mis en jeu	retrouvé	mis en jeu	retrouvé
24,75	25,05	26,4	27,4
40,6	42,0	41,6	43,0

L'examen des résultats contenus dans le tableau XVII montre que la spermine et la spermidine ne sont pas dégradées au cours des conditions opératoires adoptées pour l'hydrolyse des protéines.

IV. — SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES CATIONOIDES ET ANALYSE DES EFFLUENTS.

Nous avons procédé à la séparation chromatographique des cationoïdes présents dans l'hydrolysat par la technique décrite p. 73. L'identification et le dosage des ions sodium et potassium ainsi que des diverses bases aminées ont été effectués par les méthodes déjà décrites (voir p. 75).

Nous avons soumis à l'analyse 17 tissus et une laitance lyophilisée de poisson (*Clupea harengus*). Les chromatogrammes obtenus sont analogues quelle que soit la nature du tissu et l'espèce animale envisagées. Dans chaque cas, nous avons procédé à l'analyse des fractions de l'effluent, tout d'abord en recherchant les constituants donnant une réaction colorée avec la ninhydrine. Le graphique n° 10 constitue un exemple d'une telle analyse. Elle porte sur un extrait correspondant à 40 g de thymus de veau.

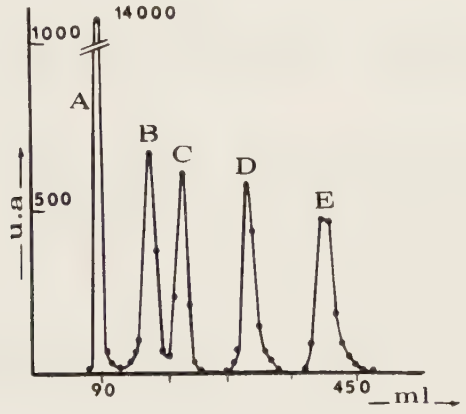


Figure n° 10. — *Schéma de la chromatographie sur Dowex 50-X2 des composés aminés présents dans un extrait de thymus (veau) (40 g) - (A = ammonium) ; B = ? ; C = arginine ; D = spermidine ; C = spermine (recherche effectuée par colorimétrie à la ninhydrine).*

Le graphique de la figure 10 montre la présence de cinq constituants aminés : A, B, C, D et E. Par différentes méthodes micro-analytiques nous avons pu identifier les composés A, C, D et E respectivement à l'ammoniaque, à l'arginine, à la spermidine et à la spermine. Le composé B n'a pu être identifié.

Nous avons alors analysé l'effluent correspondant par précipitation des composés bases fortes à l'état de periodure insoluble, ce qui est représenté sous forme de schéma dans la figure n° 11.

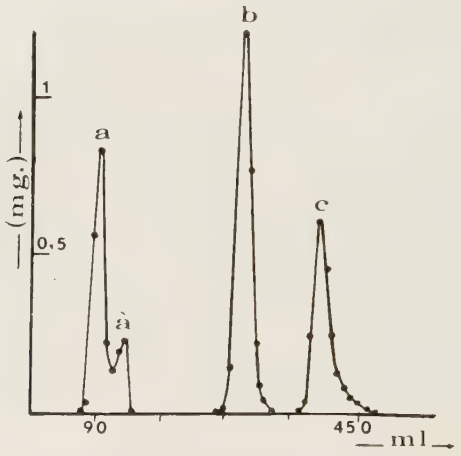


Figure n° 11. — *Schéma de la chromatographie sur Dowex 50-X-2 d'un extrait de thymus de veau (40 g) - (a = choline ; a' = ? * ; b = spermidine ; c = spermine) (dosage par précipitation sous forme de periodure).*

A l'examen de la figure n° 11 on distingue quatre constituants : a, a', b et c. Les composés a, b et c sont respectivement identifiés à la choline, la spermidine et la spermine. Le composé a' n'a pas été identifié. Nous pouvons cependant affirmer qu'il ne s'agit ni de la bétaïne, ni de la trigonelline, ni de la carnitine.

Nos analyses ont porté sur les tissus animaux suivants :

— Bœuf : foie, rein, rate, pancréas, cœur, thyroïde.
— Veau : foie, thymus.
— Rat : foie, rein, rate, pancréas.
— Lapin : foie, rein, rate, pancréas.
— Homme : placenta.
— Hareng : laitance.

L'ensemble de nos résultats est rassemblé dans le tableau n° XVIII.

(*) a' a été arbitrairement exprimé quantitativement en choline.

TABLEAU XVIII

Teneurs en sodium (mg), potassium (mg), choline (µg), spermine (µg), spermidine (µg) et arginine (µg) de différents tissus (par gramme de tissu frais).

	Na	K	Choline	Spermine	Spermidine	Arginine
Foie						
Bœuf	0,72	2,20	92	75	13	206
Veau	0,62	2,38	257	101	20	435
Rat	0,83	2,92	73	85	89	682
Lapin	0,64	4,69	89	93	traces	210
Rein						
Bœuf	1,33	1,78	234	76	14	452
Rat	1,75	2,28	267	63	31	831
Lapin	1,63	2,26	251	63	24	290
Rate						
Bœuf	0,59	6,50	54	49	31	—
Rat	1,32	4,55	88	88	120	678
Lapin	0,92	4,01	310	110	85	820
Pancréas						
Bœuf	1,29	4,80	88	328	155	3.018
Rat	1,63	3,26	110	85	507	543
Lapin	1,14	1,91	36	27	16	26
Thyroïde						
Bœuf	1,65	1,95	13	36	11	227
Cœur						
Bœuf	1,29	3,30	5	30	4	—
Thymus						
Veau	1,41	5,43	87	63	65	315
Placenta						
Homme	—	—	23	51	10	65
Laitance						
Hareng	1,11	3,67	—	77	285	—

On notera essentiellement, à l'examen des résultats contenus dans le tableau n° XVIII, l'extrême variabilité des teneurs en choline, en spermine et en spermidine d'un même tissu pour des espèces animales différentes. Ainsi le foie de rat présente une teneur élevée en spermine (89 µg/g), celui de lapin n'en contient que des traces. De même, les pancréas de bœuf et de rat contiennent de très fortes quantités de spermidine (155 et 507 µg/g) alors que le pancréas de lapin n'en renferme qu'une faible

quantité (16 µg/g). Toujours en ce qui concerne le pancréas, on constate que chez le bœuf cet organe renferme une proportion élevée de spermine par rapport à celle de spermidine (328/155) alors que ce même rapport est inversé chez le rat (85/507). On note également une variation de la teneur des tissus en fonction de l'âge de l'animal ; ainsi le foie de veau est plus riche en composés basiques que celui de bœuf. Une dernière remarque concerne la teneur importante de la laitance lyophilisée de hareng en spermidine ; la laitance peut donc constituer une source intéressante pour l'isolement de la polyamine à partir d'un produit naturel.

Dans l'ensemble le rein est l'organe qui, chez les mammifères, présente la plus forte teneur en choline extractible par notre méthode (260 µg/g en moyenne). Les autres organes ont des teneurs variables en cette base. Signalons en particulier les teneurs élevées du foie de veau (257 µg/g) et de la rate de lapin (310 µg/g) ainsi que la très faible valeur enregistrée dans l'analyse du muscle cardiaque de bœuf (5 µg/g).

Les déterminations portant sur l'arginine permettent d'apprécier la teneur des tissus en polypeptides de caractère alcalin. Les valeurs trouvées sont ici variables d'un tissu à un autre et d'une espèce animale à une autre. Le pancréas de bœuf constitue le tissu le plus riche (3.018 µg/g), par contre le placenta humain (10 µg/g) et le pancréas de lapin (26 µg/g) en sont particulièrement pauvres.

Les valeurs trouvées, en ce qui concerne la teneur en sodium et en potassium des différents tissus sont en bon accord avec celles que l'on peut relever dans la littérature.

CHAPITRE DEUXIEME

VARIATION DE LA TENEUR EN DIFFÉRENTS CATIONOIDES DES TISSUS DE RATS SOUMIS A L'INANITION PROTÉIQUE

Nous nous sommes proposée de suivre les variations des teneurs en différents cationoïdes des tissus de rats soumis à l'inanition protéique. Les expériences ont été conduites sur 13 rats mâles, âgés de six mois, d'un poids moyen de 400 g et provenant d'un même élevage. Un lot de trois animaux a été sacrifié dès le premier jour et a servi de témoin. Les rats ont été alimentés par le régime sans azote de composition suivante :

Saccharose	1.000 g
Amidon de blé	1.000 g
Beurre lavé	75 g
Huile d'arachide	200 g
Cellulose	166 g
Mélange salin (*)	166 g

La cellulose, constituée de papier filtre haché, est additionnée comme aliment encombrant. Ce régime contient de 0,4 à 0,5 mg d'azote par gramme suivant la préparation. Les animaux en consomment de 25 à 30 g par jour, quantité n'apportant qu'un taux infime d'azote. En outre, chaque animal a reçu quotidiennement les quantités de vitamines suivantes :

Huile de foie de poisson	X gouttes
Vitamine B_1	74 µg
Vitamine B_2	7,5 µg
Vitamine PP	6 µg

(*) Mélange salin d'Osborne complété avec du manganèse :

Chlorure de sodium	100 g
Phosphate tricalcique	110 g
Citrate de magnésium	65 g
Chlorure de potassium	15 g
Citrate de fer	10 g
Sulfate de manganèse	1 g
Iodure de potassium	0,1 g
Iode	0,05 g

Nous avons suivi le développement de l'anémie en pesant régulièrement les animaux. En fonction de la perte de poids moyenne enregistrée, nous avons sacrifié les animaux par groupes de deux le 21e, le 28e, le 39e, le 50e et le 65e jour. Nous présentons dans le graphique n° 12 la variation du poids moyen des rats au cours de l'expérience.

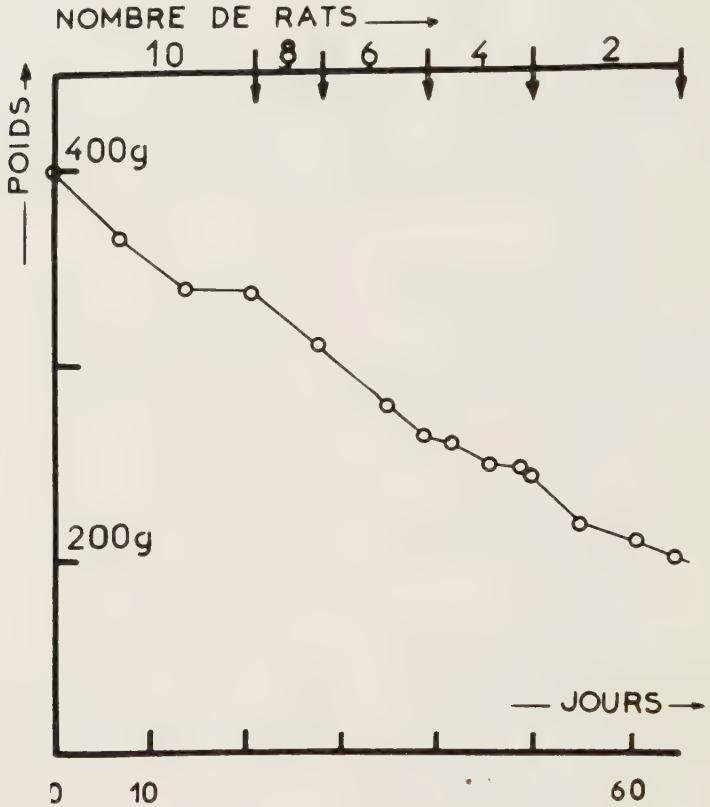


Figure n° 12. — *Variation de la perte de poids des rats au cours de l'inanition protéique.*

L'examen de la figue n° 12 montre que bien que les moyennes des poids aient été calculées à partir d'un nombre d'animaux de plus en plus réduit, l'allure générale du phénomène observé est en parfait accord avec des expériences similaires effectuées sur un nombre constant et beaucoup plus élevé de rats (195).

Dès le sacrifice d'une série de deux rats, nous avons prélevé et pesé les organes suivants : le foie (F), la rate (Ra), les reins (Re) et le pancréas (P). Nous les avons groupés en deux lots : le premier comprenant les foies (F), le second l'ensemble des autres organes (Ra + Re + P). Les teneurs en spermine (Spm), en spermidine (Spd) et en choline (Ch), en

sodium et en potassium des homogénats tissulaires ont été déterminées par les techniques décrites précédemment. L'ensemble de nos résultats est présenté sous forme de quatre graphiques (1, 2, 3 et 4) dans la figure n° 13 et dans le tableau n° XIX.

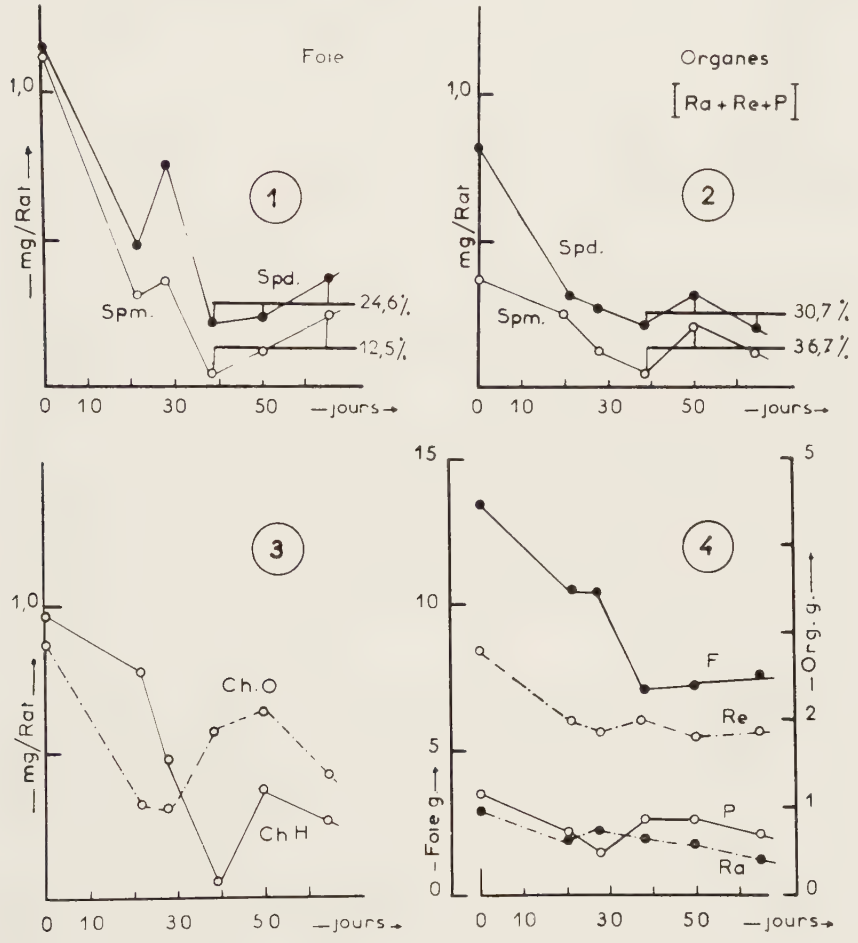


Figure n° 13 :

1 : *variations de la teneur en spermine (Spm) et en spermidine (Spd) du foie de rat au cours de l'inanition protéique.*

2 : *variations de la teneur en spermine (Spm) et en spermidine (Spd) d'organes de rat (Rate + Reins + Pancréas : Ra + Re + P) au cours de l'inanition protéique.*

3 : *variations de la teneur en choline hépatique (Ch. H) et de l'ensemble des organes : Rate + Reins + Pancréas (CH. O) au cours de l'inanition protéique chez le rat.*

4 : *variations des poids du foie (F), des reins (Re), de la rate (Ra) et du pancréas (P) au cours de l'inanition protéique chez le rat.*

Dans le graphique 4 de la figure n° 13 nous avons rassemblé les variations des poids des différents organes au cours de l'expérience. Il ressort de l'examen de ce graphique que pendant le premier mois du régime aprotéique, nos animaux ont subi une perte pondérale importante. Par comparaison avec le poids des différents organes des sujets témoins on note que chez les animaux inanitiés, le poids du foie (F) ne représente plus que 54 p. 100, celui de la rate 55 p. 100, des reins 65 p. 100 et du pancréas 70 p. 100.

L'examen du graphique 1 de la figure n° 13 montre qu'au cours du premier mois de l'expérience, les quantités de spermine (Spm) et de spermidine (Spd) contenues dans les foies diminuent d'une façon spectaculaire. Par comparaison avec les résultats enregistrés chez les animaux normaux, on constate la disparition de 96 p. 100 de la spermine et de 81 p. 100 de la spermidine hépatiques. Au-delà du 40e jour de l'expérience on note une faible élévation de la teneur en polyamines suivie d'une stabilisation se prolongeant jusqu'à la fin de l'essai. On ne retrouve, au cours de cette période, que 24 p. 100 de la spermidine et 12,5 p. 100 de la spermine présentes dans le foie des animaux témoins.

On observe un phénomène analogue en ce qui concerne la variation de la teneur en polyamines des autres organes étudiés (Ra + Re + P) comme le montre l'examen du graphique 2 de la figure n° 13. Pendant les 40 premiers jours d'inanition protéique on note une importante chute, suivie au cours des derniers jours d'une stabilisation de la teneur en cationoïdes des tissus. Par comparaison avec les organes des animaux témoins, on ne retrouve que 30,7 p. 100 de la spermidine et 36,7 p. 100 de la spermine.

Le schéma 3 de la figure n° 13 illustre les variations de la teneur en choline hépatique (Ch. H.) et des autres organes (Ch. O) en fonction de la durée de l'inanition ; au cours du premier mois les animaux perdent 93 p. 100 de la choline hépatique et 75 p. 100 de la choline contenue dans les autres organes considérés. Cette baisse est suivie d'une augmentation qui précède une nouvelle diminution de la teneur en choline des tissus analysés.

Nous avons rassemblé dans le tableau n° XIX nos résultats relatifs aux dosages des ions sodium et potassium d'une part dans le foie, et d'autre part dans le mélange des autres organes (Reins + Rate + Pancréas).

TABLEAU XIX

Variations de la teneur en ions sodium et potassium du foie et du mélange d'organes (reins + rate + pancréas) au cours de l'inanition protéique chez le rat (en mg/g de tissu frais).

Durée de l'inanition (en jours)	Foie		Reins + Rate + Pancréas	
	Na	K	Na	K
0	0,83	2,92	1,63	2,85
21	0,77	2,48	2,70	3,74
28	1,24	3,06	2,53	3,31
39	1,26	2,40	2,62	3,73
50	0,97	2,43	4,48	5,08
65	1,32	3,00	—	5,50

De l'examen des résultats contenus dans le tableau XIX il ressort qu'en règle générale, la teneur des tissus en ions sodium et potassium augmente au cours de l'inanition protéique. Ceci est particulièrement significatif en ce qui concerne la teneur en sodium et potassium de l'ensemble des organes comprenant les reins, la rate et le pancréas.

L'ensemble de nos résultas permet de décrire au cours de l'inanition protéique chez le rat deux phases en ce qui concerne les variations de la teneur des organes en polyamines. Dans la première on assiste à une rapide et très importante diminution de la teneur des tissus en spermine et en spermidine. Cette période se situe au cours du premier mois et correspond soit à un épuisement des réserves, soit à un ralentissement considérable des possibilités de biosynthèse.

Dans une deuxième phase, et malgré la sévérité de l'expérimentation, on note que les différents organes conservent des quantités appréciables de cationoïdes azotés. Ces quantités très réduites qui subsistent dans la période terminale de l'inanition protéique nous paraissent représenter les valeurs minimales compatibles avec le rôle biologique certainement très important de ces polyamines.

Les variations irrégulières observées dans les teneurs en choline du foie et des autres organes ne peuvent s'interpréter qu'en fonction de la multiplicité des processus biologiques dans lesquels cette base aminée est impliquée.

L'augmentation de la teneur en ions sodium et potassium des tissus laisse penser à un phénomène de défense qui permet de compenser en particulier la perte des cationoïdes organiques azotés observée au cours de l'inanition protéique.

CHAPITRE TROISIEME

VARIATION DE LA TENEUR EN DIFFÉRENTS CATIONOIDES DE TISSUS D'ANIMAUX (RAT ET LAPIN) SOUMIS A L'INTOXICATION PAR LA PHÉNYLHYDRAZINE

I. — EXPERIMENTATION SUR LE RAT.

Notre expérience a porté sur un lot homogène de six rats adultes. Trois animaux choisis au hasard ont été sacrifiés le premier jour de l'expérience. Les foies, pancréas, reins et rates ont été prélevés et pesés. Les cationoïdes sont dosés dans les différents organes. Ces résultats constituent les valeurs témoins de l'essai. Les autres animaux, soumis à un régime normal d'alimentation, sont traités par la phénylhydrazine. L'administration du toxique est effectuée par injections intrapéritonéales d'un ml de solution à 5 p. 1.000 de chlorhydrate de phénylhydrazine par rat, le premier et le quatrième jours de l'expérience. Nous avons suivi l'anémie instaurée par la numération des érythrocytes et par la détermination du pourcentage de réticulocytes présents dans le sang prélevé par ponctions caudales. Ces déterminations sont effectuées au moyen des techniques classiques de l'hématologie (195). Le tableau n° XX contient les résultats de ces déterminations.

TABLEAU XX

Variation du nombre d'hématies ($10^6/mm^3$) et du pourcentage de réticulocytes chez le rat en fonction de la durée de l'intoxication par la phénylhydrazine.

Rats n°	1er jour		3e jour		8e jour	
	Erythr.	Réticul.	Erythr.	Réticul.	Erythr.	Réticul.
1	8,45	< 1	6,59	5	4,01	97
2	8,73	< 1	6,91	4	4,94	97
3	8,42	< 1	6,92	6	3,15	98

L'examen des résultats contenus dans le tableau XX montre qu'en huit jours la diminution du nombre des hématies est de 50 p. 100 alors que la proportion des réticulocytes atteint 98 p. 100. Les animaux sont sacrifiés et les organes sont prélevés et pesés.

Le tableau n° XXI contient les résultats relatifs aux poids des différents organes des animaux témoins et des animaux intoxiqués.

TABLEAU XXI

Comparaison des poids et des organes des animaux témoins et des rats intoxiqués par la phénylhydrazine

Rats	Poids des animaux en g		Poids des organes (en g)			
	avant intox.	après intox.	Foie	Rate	Reins	Pancréas
Témoins						
N° 1	238	—	7,60	0,765	2,00	1,157
N° 2	249	—	8,03	0,805	1,86	0,551
N° 3	200	—	7,46	0,745	2,047	0,946
Moyenne	229	—	7,46	0,745	1,97	0,890
Intoxiqués						
N° 4	175	137	5,86	0,91	2,18	1,05
N° 5	195	167	5,61	0,71	1,77	1,10
N° 6	190	183	5,57	1,40	1,66	1,14
Moyenne	187	162	5,68	1,01	1,87	1,10

De l'examen des résultats contenus dans le tableau XXI il ressort que l'intoxication par la phénylhydrazine conduit à une perte extrêmement rapide et notable du poids des animaux (— 13 p. 100) et de leur foie (— 22,5 p. 100). Par contre si le poids des reins est pratiquement identique chez tous les animaux nous observons une nette augmentation du poids moyen des pancréas (+ 20 p. 100) et des rates (+ 23 p. 100) chez les animaux intoxiqués.

Nous avons dosé les cationoïdes dans les différents organes des animaux témoins et des animaux traités. Nous avons exprimé nos résultats en quantité de cationoïdes présents dans un gramme de tissu frais et en quantité de cationoïdes contenus dans un organe d'un animal moyen. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux n° XXII et n° XXIII.

TABLEAU XXII

Comparaison des teneurs en cationoïdes des différents organes chez le rat normal et chez l'animal intoxiqué par la phénylhydrazine (en poids de cationoïdes par gramme de tissu frais).

	Foie		Pancréas		Reins		Rate	
	Témoin	Intox.	Témoin	Intox.	Témoin	Intox.	Témoin	Intox.
Na (mg/g)	0,88	0,88	2,11	2,43	1,69	1,60	0,84	1,60
K (mg/g)	2,67	2,65	2,13	3,67	2,12	1,60	4,05	3,80
Choline (µg/g) ..	118	182	120	276	347	324	330	305
Spermine (µg/g)..	96	127	90	89	60	35	96	40
Spermidine (µg/g)	60	71	450	438	17	12	96	52

TABLEAU XXIII

Comparaison des teneurs en cationoïdes des différents organes chez le rat normal et chez l'animal intoxiqué par la phénylhydrazine (en poids de cationoïdes pour un animal moyen).

	Foie		Pancréas		Reins		Rate	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai
Na (mg/g)	6,56	5,00	1,88	2,67	3,33	2,99	0,63	1,61
K (mg/g)	19,92	15,05	1,89	4,04	4.17	2.99	3 02	3,83
Choline (µg/g) ..	880	1034	107	304	684	606	246	308
Spermine (µg/g)..	716	721	80	98	118	65	72	40
Spermidine (µg/g)	447	403	400	482	33	22	72	52

L'examen des résultats contenus dans les tableaux XXII et XXIII montre que le sens des variations observées dans la teneur en cationoïdes des tissus chez l'animal normal et chez le rat intoxiqué diffère selon l'organe et le cationoïde envisagé. On note ainsi que :

— Les réserves hépatiques de l'animal demeurent sensiblement constantes. L'augmentation de la teneur en cationoïdes du foie est compensée par la perte de poids de l'organe.

— Le pancréas des animaux intoxiqués est aussi riche en polyamines que celui des animaux témoins. Ici la baisse de la teneur en spermine et en spermidine du tissu correspond à une élévation du poids du pancréas. Néanmoins on constate une élévation de la teneur en choline.

— La toxicité de la phénylhydrazine au niveau rénal est illustrée par une chute importante de la teneur en polyamines de cet organe d'élimination.

— On note une nette augmentation du poids de la rate. On constate également une légère élévation de la teneur en choline et une nette diminution du taux de spermine et de spermidine. Ceci peut être interprété soit comme une diminution de la biosynthèse des polyamines, soit comme un accroissement de la consommation de ces cationoïdes, consommation qui n'est pas compensée par une élévation consécutive de la production de ces composés dans le temps relativement court de l'expérience.

II. — EXPERIMENTATION CHEZ LE LAPIN.

Notre expérience a porté sur deux lapins (Géant des Flandres) : le premier d'un poids de 3,6 kg a été sacrifié et a servi de témoin, le second d'un poids de 3,7 kg a été traité par la phénylhydrazine. Le toxique est administré par voie sous-cutanée à la dose de 360 mg de son chlorhydrate en solution dans 5 ml d'eau distillée. Les injections sont pratiquées le premier, le troisième et le septième jour de l'expérience. Nous avons suivi

l'établissement de l'anémie expérimentale par des déterminations hématologiques portant sur le nombre de globules rouges et le pourcentage de réticulocytes du sang prélevé par ponction de la veine marginale de l'oreille. Les résultats de ces déterminations sont rassemblés dans le tableau n° XXIV.

TABLEAU XXIV

Variation du nombre d'hématies ($10^6/mm^3$) et du pourcentage de réticulocytes chez le lapin en fonction de la durée d'intoxication par la phénylhydrazine.

Jour du prélèvement	Erythrocytes 10^6	Réticulocytes %
1	7,53	0,8
2	5,94	2,5
4	3,47	8,0
7	1,95	45,0

L'examen des résultats contenus dans le tableau XXIV montre la sévérité de l'anémie observée en l'espace d'une semaine. L'animal a été sacrifié le huitième jour.

Les organes (foie, rate, reins et pancréas) des deux animaux sont prélevés et pesés. Les cationoïdes sont dosés dans les différents prélèvements. Les résultats de ces analyses sont rassemblés dans le tableau n° XXV.

TABLEAU XXV

Poids du foie, de la rate, des reins et du pancréas ainsi que leur teneur en sodium, potassium, choline, spermine, spermidine et arginine d'un lapin normal (T) et d'un lapin anémié par la phénylhydrazine (E).

	Foie		Pancréas		Reins		Rate	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai
Poids (g)	76,43	98,5	22,03	16,34	15,9	5,22	2,43	5,22
Sodium (mg/g) ..	0,64	—	1,14	1,70	1,63	1,91	0,92	2,30
Potassium (mg/g)	4,69	—	1,91	1,22	2,26	2,30	4,01	4,20
Choline (µg/g) ..	89	38	36	61	251	220	310	362
Spermine (µg/g)	93	5	27	11	63	104	110	90
Spermidine (µg/g)	traces	36	16	15	24	21	85	99

Il ressort de l'examen des résultats consignés dans le tableau n° XXV que :

— les variations les plus notables sont observées au niveau du foie. On constate une chute très importante de la teneur de l'organe en spermine et l'apparition de quantité moyennement élevée de spermidine, ce qui est remarquable pour un tissu qui, à l'état normal, n'en contient que des traces.

— on n'observe pas de modifications de la teneur en cationoïdes du pancréas, des reins et de la rate de l'animal intoxiqué par rapport à celle de l'animal témoin. Les différences observées peuvent être mises légitimement sur le compte des variations individuelles.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Arrivée au terme de nos recherches il convient maintenant de résumer notre travail et d'en dégager les principales conclusions.

Nous avons tenu à rassembler une documentation bibliographique assez étendue afin de préciser l'état actuel des connaissances sur la biochimie de la spermine et de la spermidine. Les polyamines sont présentes dans tous les tissus des êtres vivants. Si les voies de la biosynthèse de la spermidine sont connues, par contre celles de la spermine nécessitent encore des informations complémentaires pour être définitivement établies.

Les nombreuses recherches effectuées ces dernières années soulignent l'intérêt suscité par les polyamines. On leur assigne des rôles multiples dans la vie cellulaire ; elles stabilisent les membranes et ont une affinité particulière pour les acides nucléiques. Elles sont impliquées dans des réactions de transfert de radicaux et sont considérées comme activateurs de certains systèmes enzymatiques. Ce sont des facteurs de compétition vis-à-vis d'autres composés cellulaires de caractère alcalin.

Il faut noter également l'importance biologique de leurs dérivés (acétylés, guanidylés, du type « glutathion »). En outre les produits de leur métabolisme, que l'on suppose être de nature aldéhydique, semblent avoir une activité élevée et parfois différente de celles des polyamines elles-mêmes. Ceci permet d'expliquer dans une certaine mesure, les actions contradictoires des bases azotées, telles par exemple celles relatives au fait qu'elles constituent des facteurs indispensables pour certains micro-organismes et des substances bactériostatiques pour d'autres.

On assigne, en général, à la spermine et à la spermidine un rôle essentiellement intracellulaire chez les êtres supérieurs.

Les difficultés rencontrées dans l'étude des polyamines sont de nature analytique. Aussi nous sommes-nous attachée à mettre au point une technique générale applicable aux milieux biologiques. L'intérêt et le but de nos recherches étant ainsi précisés, nous résumons ci-après les résultats de notre travail.

I. - Dans la domaine de la biochimie analytique, nous avons mis au point un ensemble de techniques destiné à l'extraction, à l'identification et au dosage des cationoïdes tissulaires.

a) en ce qui concerne l'extraction des bases azotées nous proposons l'utilisation d'un procédé original que nous désignons sous le terme de *double échange simultané*. Le principe de la méthode consiste à faire agir

sur une solution une résine cationique et une résine anionique séparées par un diaphragme. On récupère la résine cationique qui a fixé les composés de caractère fortement alcalin que nous désignons pour cela *cationoïdes*. Parmi ceux extraits des homogénats tissulaires signalons : la choline, les polyamines (spermine et spermidine), les diamino-acides (histidine, lysine, arginine), des polypeptides riches en ces derniers ainsi que les ions sodium et potassium.

b) à la suite d'études ayant porté sur la justification des différents temps opératoires, nous sommes en mesure de proposer la méthode suivante qui comporte cinq étapes principales, à savoir :

1° la déprotéinisation des homogénats tissulaires par la chaleur en milieu acide (pH = 5).

2° le traitement des filtrats de déprotéinisation par la technique d'absorption par double échange simultané. Les cationoïdes sont élués de la résine carboxylique en milieu chlorhydrique.

3° l'hydrolyse chlorhydrique de l'éluat.

4° la chromatographie de l'hydrolysat sur une résine sulfonique selon la technique de Tabor et coll. (186) que nous avons perfectionnée à cette occasion.

5° le dosage de la spermine et de la spermidine ainsi séparées sous forme de periodures. Ces déterminations sont fondées sur le principe suivant : les solutions de polyamines traitées par un réactif iodo-ioduré concentré abandonnent les bases à l'état de periodures insolubles, faciles à isoler et dont la teneur en iode métalloïdique est définie. On termine le dosage de l'iode combiné au moyen d'une solution titrée d'hyposulfite. On peut ainsi doser de 200 à 800 µg de spermine ou de spermidine avec une précision de ± 2 p. 100 et des quantités de l'ordre de 50 µg avec une précision de ± 5 p. 100. Ce procédé est directement inspiré de la méthode de dosage de la choline et de la bétaïne, proposée par Kahane (44).

Comme on le voit, notre technique présente deux innovations : la première consiste à purifier le filtrat de déprotéinisation par double échange simultané, la seconde réside dans le dosage iodométrique des polyamines.

La technique chromatographique mise en œuvre permet en outre de séparer et de doser dans les fractions recueillies les autres cationoïdes tels que la choline présente dans les liqueurs de défécation et l'arginine provenant de l'hydrolyse des polypeptides alcalins et enfin, les ions sodium et potassium.

II. - Au moyen de la technique que nous avons mise au point, nous avons poursuivi nos recherches dans le but d'établir les teneurs en cationoïdes des 18 tissus animaux suivants : foie, rate, rein, pancréas, cœur et thyroïde de bœuf, foie et thymus de veau, foie, rein, rate et pancréas de rat et de lapin, placenta humain et laitance de hareng.

De l'ensemble des déterminations effectuées, il ressort l'extrême variabilité des teneurs en cationoïdes d'un même tissu pour des espèces animales

différentes. Nos résultats confirment en ce sens ceux obtenus par ROSENTHAL et coll. (156).

III. - On sait que les amino-acides et plus particulièrement la méthionine, l'arginine et l'ornithine sont à l'origine de la biosynthèse de la spermine et de la spermidine. Aussi avons-nous jugé intéressant de poursuivre nos recherches par l'étude des variations de la teneur des principaux organes en polyamines au cours de l'inanition protéique prolongée chez le rat.

Nos résultats mettent en évidence un minimum vital en polyamines des tissus qui ne peut s'accorder qu'avec un caractère préférentiel de la biosynthèse des polyamines. Ceci nous conduit à envisager un cycle rapide de « turn-over » de ces polyamines (185).

IV. - Nous avons également étudié les variations des teneurs des tissus des principaux organes chez le rat et le lapin au cours de l'intoxication de ces animaux par la phénylhydrazine. L'action principale de ce toxique consiste en une anémie sévère. Nous avons observé qu'il agit différemment selon l'espèce animale envisagée. Chez le rat, l'atteinte est essentiellement notable sur le rein et la rate. Ces organes voient leur teneur en spermine et en spermidine décroître d'une façon significative. En ce qui concerne le lapin l'action se fait sentir au niveau du foie. Elle se traduit par une diminution de la teneur de l'organe en spermine et l'apparition d'une quantité moyennement élevée de spermidine. Ceci est assez remarquable pour un tissu qui, à l'état normal, ne contient que des traces de spermidine. On peut interpréter ce fait en fonction de l'hypothèse généralement admise que la biosynthèse de la spermidine précède celle de l'autre polyamine.

EN RESUME, nous avons décrit dans notre thèse tout d'abord une technique de dosage des cationoïdes, et plus particulièrement de la spermine et de la spermidine, dans les milieux biologiques. Cette méthode originale nous a conduit à établir un tableau de répartition de ces composés dans 18 tissus d'animaux normaux. Elle nous a permis également, sur le plan biochimique, de suivre les variations des cationoïdes dans les tissus d'animaux soumis à un régime aprotéique. Nous avons pu montrer que la biosynthèse de la spermine et de la spermidine se faisait d'une manière préférentielle au cours de la carence azotée chez le rat et en conclure que ces composés étaient indispensables à la vie cellulaire. Enfin, nous avons pu observer au cours d'expériences portant sur l'intoxication au moyen de la phénylhydrazine du rat et du lapin, que le toxique a une action inhibitrice sur la chaîne catabolique conduisant à la biosynthèse des polyamines.

Lu et approuvé.

Le Président du Jury :

J.-C. DUMAZERT.

Vu et approuvé.

Pour le Doyen, l'Assesseur :

L. VIGNOLI.

Vu et permis d'imprimer.
Aix, le 27 juin 1966.

Le Recteur : C. FRANCK.

BIBLIOGRAPHIE

1 — Ackermann (D.). — *J. Physiol. Chem.*, 1952, **291**, 169.

2 — Ackermann (D.). — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1955, **302**, 87.

3 — Ames (B.N.) et Dubin (D.T.). — *J. Biol. Chem.*, 1960 **235**, 769.

4 — Ames (B.N.), Dubin (D.T.) et Rosenthal (S.M.). — *Science*, 1958, **127**, 814.

5 — Amoz (S.) et Mager (J.). — *Bull. Res. Council Israël*, 1962, **11** A, 67.

6 — Anderson (N.G.) et Norris (C.B.). — *Exp. Cell. Res.*, 1960, **19**, 605.

7 — Ardizzone (G.) et Ricci (P.). — *Quaderni Clin. Ostet. e Ginecol.*, 1955, **10**, 717.

8 — Artaud (C.). — Thèse de Pharmacie, Marseille, 1960.

9 — Asator (A.M.). — *J. Chromatog.*, 1960, **4**, 144.

10 — Aschkenasy (A.). — *Sang*, 1946, **17**, 34.

11 — Austerweil (G.V.). — L'échange d'ions et les échangeurs, Paris, Gauthier-Villars éd., 1955.

12 — Bachrach (U.) et Bar-Or (R.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1960, **40**, 545.

13 — Bachrach (U.) et Cohen (J.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1961, **26**, 1.

14 — Bachrach (U.), Persky (S.) et Razin (S.). — *Biochem. J.*, 1960, **76**, 306.

15 — Bernfeld (P.), Bernfeld (H.C.), Nisselbaum (J.S.) et Fishman (W.H.). — *J. Amer. Soc.*, 1954, **76**, 4872.

16 — Bertossi (F.), Bagni (N.), Moruzzi (G.) et Caldarera (C.M.). — *Exp.*, 1965, **XXI**, 80.

17 — Beyer (K.H.) et Skinner (J.T.). — *J. Pharmacol. Exp. Thér.*, 1940, **68**, 419.

18 — Bichowski-Slomnitzki (L.). — *J. Bact.*, 1948, **55**, 33.

19 — Blaschko (H.). — *Advanc. comp. Phys. Biochem.*, 1962, **1**, 67.

20 — Blaschko (H.) et Bonney (R.). — *Proc. roy. Soc. Ser. B.*, 1962, **156**, 268.

21 — Blaschko (H.) et Hawes (R.). — *J. Physiol.*, 1959, **145**, 124.

22 — Boettcher (A.). — *Virchows Arch.*, 1865, **32**, 525 .

23 — Bragg (P.D.) et Polglase (W.J.). — *J. Bact.*, 1963, **85**, 590 et 795.

24 — Breton (J.). — Thèse de Pharmacie, Bordeaux, 1958.

25 — Brock (T.D.) et Wooley (S.O.). — *Science*, 1963, **141**, 1065.

26 — Brown (A.D.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1960, **44**, 178.

27 — Burchfield (H.P.) et Storrs (E.E.). — Biochemical applications of gas chromatography, p. 289, Academic Press, New York, 1962.

28 — Cantoni (G.L.). — *Nature*, 1960, **188**, 300.

29 — Cantoni (G.L.) et Durell (J.). — *J. Biol. Chem.*, 1957, **225**, 1033.

30 — Charcot (J.M.) et Robin (C.P.). — *C.R. Soc. Biol.*, Paris, 1853, **5**, 44.

31 — Cincotta (J.J.) et Feinland (R.). — *Analyt. Chem.*, 1962, **34**, 774.

32 — Clarke (D.D.), Mycek (M.J.), Neidle (A.) et Waelsch (H.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **79**, 338.

33 — Clarke (D.D.), Mycek (M.J.), Neidle (A.) et Waelsch (H.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, **71**, 277.

34 — Clarke (D.D.), Neidle (A.), Sarkar (N.K.) et Waelsch (H.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **71**, 277.

35 — Cohen (S.S.) et Lichtenstein (J.). — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 2112.

36 — Cohn (E.J.) et Coll. — *J. Biol. Chem.*, 1928, **77**, 325.

37 — Colarcurci (A.). — *Arch. Ostet. Ginec.*, 1953, **58**, 334.

38 — Dakin (H.), Ungley (C.) et West (R.). — *J. Biol. Chem.*, 1935, **109**, 489.

39 — Danzig (M.) et Schultz (H.P.). — *Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 1836.

40 — Davidson (D.) et Anderson (N.G.). — *Exptl. Cell. Research.*, 1960, **20**, 610.

41 — Del Piano, Lisi (B.) et Pasqualucci (E.). — *Rif. med.*, 1963, **77**, 785.

42 — Dubin (D.T.). — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 783.

43 — Dubin (D.T.) et Rosenthal (S.M.). — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 776.

44 — Ducet (G.) et Kahane (E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 794.

45 — Dudley (H.W.), Rosenheim (M.C.) et Rosenheim (O.). — *Biochem. J.*, 1924, **18**, 1263.

46 — Dudley (H.W.) et Rosenheim (O.). — *Biochem., J.*, 1925, **19**, 1034.

47 — Dudley (H.W.), Rosenheim (O.) et Starling (W.W.). — *Biochem. J.*, 1926, **20**, 1082.

48 — Dudley (H.W.), Rosenheim (O.) et Starling (W.W.). — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1926, **159**, 199.

49 — Dudley (H.W.), Rosenheim (O.) et Starling (W.W.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 97.

50 — Dumazert (C.). — *Ann. Nutr. Alim.*, 1947, **1**, 361.

51 — Dumazert (C.) et Ghiglione (C.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1953, **235**, 1170.

52 — Dumazert (C.) et Ghiglione (C.). — *Bull. Soc. Pharm. Marseille*, 1956, **5**, 299.

53 — Dumazert (C.) et Ghiglione (C.). — *Bull. Soc. Pharm. Marseille.* 1960, **9**, 145 et 161.

54 — Dumazert (C.), Ghiglione (C.) et Dinh-Van-Hoang. — IX[e] Congrès des Sociétés de Pharmacie de France, G. de Bussac édit., Clermont-Ferrand, 1957, p. 129.

55 — Dumazert (C.) et Grac (S.). — *Arch. Sc. Physiol.*, 1947, **1**, 339.

56 — Dumazert (C.) et Marcelet (Y.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 201.

57 — Dumazert (C.) et Poggi (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, **21**.

58 — Dumazert (C.) et Vo Van (L.). — *Bull. Soc. Pharm. Marseille*, 1964, **13**, 243.

59 — Engel (R.W.), Salmon (W.D.) et Ackerman (C.J.). — Methods or Biochemical analysis, Glick (D.), éd. Volume 1, p. 265, *Interscience publ. inc.*, N-Y.

60 — Erikson (B.N.), Avrin (I.), Teague (D.M.) et Williams (H.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, **135**, 671.

61 — Evans (E.A. Jr.), Vennesland (B.) et Schneider (J.T.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1939, **41**, 467.

62 — Felsenfeld (G.). — The Molecular Basis of Neoplasia, p. 104, University of Texas Press, Austin, 1962.

63 — Felsenfeld (G.) et Huang (S.L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **51**, 19.

64 — Fiessinger (N.) et Laur (C.M.). — *Le Sang*, 1932, **6**, 316.

65 — Fischer (F.G.) et Bohn (H.). — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1957, **308**, 108.

66 — Fischer (F.G.) et Bohn (H.). — *Liebigs Ann.*, 1957, **603**, 232.

67 — François (C.) et Seguin (L.). — Cité par Paris (R.), *Ann. Pharm. Franç.*, 1955, **13**, 362.

68 — Fuchs (H.). — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1939, **257**, 149.

69 — Gorkin (V.Z.), Avakyan (A.A.), Verevkina (I.V.) et Komissarova (N.V.). — *Vop. Med. Klin.*, 1962, **8**, 638, Translated in *Fed. Proc.*, 1963, **22**, T 619.

70 — Greene (R.C.). — *J. Am. Chem Soc.*, 1957, **79**, 3929.

71 — Grossowicz (N.) et Ariel (M.). — *J. Bact.*, 1963, **85**, 293.

72 — Grossowicz (N.), Razin (S.), et Rozansky (R.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1955, **13**, 436.

73 — Guggenheim (M.). — Die Biogenen Amine, 4 th éd., S. Karger ed., Basel 1951.

74 — Ham (R.G.). — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **14**, 34.

75 — Hamalainen (R.). — *Acta Soc. Med.* « *Duodecim* », 1941, Ser. A, **23**, 97.

76 — Harding (V.J.). — *Trans. Roy. Soc. Can.*, Sec. III, 1915, **9**, 33.

77 — Harding (V.J.) et Mc Lean (R.M.). — *J. Biol. Chem.*, 1916, **25**, 319.

78 — Harrisson (G.A.). — *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1885.

79 — Harrisson (G.A.). — *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1152.

80 — Herbst (E.J.), Glinos (E.B.) et Amundsen (L.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, **214**, 175.

81 — Herbst (E.J.), Keister (D.L.) et Weaver (R.H.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **75**, 178.

82 — Herbst (E.J.) et Snell (E.E.). — *J. Biol. Chem.*, 1949, **181**, 47.

83 — Herbst (E.J.), Weaver (R.H.) et Keister (D.L.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **75**, 171.

84 — Herbst (E.J.) et Witherspoon (B.H.). — *Fed. Proc.*, 1960, **19**, 138.

85 — Hershko (A.), Amoz (S.) et Mager (J.). — *Bull. Res Council Israël*, 1961, **10** A, 37.

86 — Hill (J.H.). — *Cancer*, 1963, **16**, 542.

87 — Hill (J.H.) et Mann (P.J.G.). — *Biochem. J.*, 1964, **91**, 171.

88 — Hirsch (J.G.). — *J. Exptl. Med.*, 1953, **97**, 323.

89 — Hirsch (J.G.). — *J. Exptl. Med.*, 1953, **97**, 327.

90 — Hirsch (J.G.). — *J. Exptl. Med.*, 1953, **97**, 355.

91 — Hirsch (J.G.) et Dubos (R.J.). — *J. Exptl. Med.*, 1952, **95**, 191.

92 — Hoppe-Seyler. — *Zeit. f. Physiol. Chem.*, 1885, **IX**, 34.

93 — Jakson (E.L.) et Rosenthal (S.M.). — *J. Org. Chem.*, 1960, **25**, 1055.

94 — Jeffree (G.M.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1956, **20**, 503.

95 — Jeffree (G.M.). — *Biochem. J.*, 1959, **58**, 37 P.

96 — Kamat (V.B.). — *Nature*, Lond., 1962, **196**, 1206.

97 — Kay (D.). — *Biochem. J.*, 1959, **73**, 749.

98 — Kay (D.) et Fildes (P.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1962, **27**, 143.

99 — Keister (D.L.). — Doctorat Thesis University of Maryland, Medical School, Baltimore Md. 1958.

100 — Kewitz (H.). — *Naturwiessenschaften*, 1959, **46**, 495.

101 — Kihara (H.) et Snell (E.E.). — *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1957, **43**, 867.

102 — Kirschenbaum (D.M.) et Parker (F.S.). — *Spectrochim. Acta*, 1961, **17**, 785.

103 — Kormendy (K.) et Horvath (Z.). — *Acta Chim, Acad. Sci. Hung.*, 1954, **4**, 5.

104 — Kosari (T.), Ikoda (T.), Kotani (Y.), Nakagawa (S.) et Saka (T.). — *Science*, 1958, **157**, 1176.

105 — Kosaki (T.) et Nakagawa (S.). — *Proc. Japan Acad.*, 1958, **34**, 293.

106 — Kuretani (K). — *Kagaku Kenkysho Hokoku*, 1957, **80**, 33.

107 — Ladenburg (A.) et Abel (J.). — *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1888, **21**, 758.

108 — Lahdevirta (J.), Raina (A.) et Heikel (T.). — *Scand. J. Clin. lab. investigation*, 1957, **9**, 345.

109 — Lansford (E.M. Jr.), Turner (R.B.), Weathersbee (C.J.) et Shive (W.). — *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 497.

110 — Lockart (I.M.). — *Nature*, 1956, **177**, 393.

111 — Macpherson (H.T.). — *Biochem. J.*, 1942, **36**, 59.

112 — Mc Intire (F.C.), Clements (L.W.) et Sproull (M.). — *Analyt. Chem.*, 1953, **25**, 1757.

113 — Mager (J.). — *Nature*, 1955, **176**, 933. — 1959, **183**, 1825.

114 — Mager (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **36**, 529.

115 — Magnus (R.). — *Pflüg. Arch. Ges. Physiol.*, 1905, **108**, 1.

116 — Mandelstam (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **22**, 313.

117 — Mandelstam (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **22**, 324.

118 — Mann (P.J.G.). — *Biochem. J.*, 1955, **59**, 609.

119 — Martin (R.G.) et Ames (B.N.). — *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 1962, **48**, 2171.

120 — Massart (L.). — *Nature*, 1948, **162**, 779.

121 — Miller (A.K.) et Peters (L.). — *Arch. Biochem.*, 1945, **6**, 281.

122 — Misra (D.K.) et Adamson (R.H.). — *Life Sc.*, 1963, n° 11, 858.

123 — Moller (V.). — *Acta path. microbiol. Scand.*, 1955, **36**, 158.

124 — Moore (S.) et Stein (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 907.

125 — Moruzzi (G.) et Caldarera (C.M.). — *Arch. Biochem. Biophys. U.S.A.*, 1964, **105** n° 1, 109.

126 — Moruzzi (G.) et Caldarera (C.M.). — *Arch. Biochem. Biophys.* 1964, **105**, 209.

127 — Moubasher (R.) et Othman (A.M.). — *J. Am. Soc.*, 1950, **72**, 2666.

128 — Moubasher (R.) et Othman (A.M.). — *J. Am. Soc.*, 1950, **72**, 2667.

129 — Neidle (M.J.) et Waelsch (H.). — *Fed. Proc.*, 1960, **19**, 336.

130 — Neuberg (C.). — *Biochem. Z.*, 1913, **56**, 500.

131 — Ogata (A.) et Komoda (T.). — *J. Pharm. Soc. (Japan)*, 1943, **63**, 653.

132 — Raina (A.). — *Acta Chem. Scand.*, 1962, **16**, 2463.

133 — Raina (A.). — *Acta Chem. Scand.*, 1962, **16**, 2464.

134 — Raina (A.). — *Acta Phys. Scand.*, 1963, **60**, Suppl. 218.

135 — Raina (A.). — *Acta Chem. Scand. Danem.*, 1964, **18**, 9, 2188.

136 — Raina (A.), Janne (J.) et Siimes (M.). — *Acta Chem. Scand.*, 1964, **18**, 1804.

137 — Razin (S.), Bachrach (U.) et Gery (I.). — *Nature*, 1958, **181**, 700.

138 — Razin (S.), Cohen (A.) et Rozansky (R.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, 1958, **99**, 459.

139 — Razin (S.), Gery (I.) et Bachrach (U.). — *Biochem. J.*, 1959, **71**, 551.

140 — Razin (S.) et Rozansky (R.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **81**, 36.

141 — Redenz (E.). — *Pflüg. Arch. ges. Phys.*, 1927, **216**, 605.

142 — Reifer (I.). — *N. Zealand J. Sc. Technol.*, 1940, **22**, 111 B.

143 — Repaske (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **30**, 225.

144 — Rhodes (J.B.) et Williams-Ashman (H.G.). — *Med. Exp.*, 1964, **105**, 281.

145 — Risetti (U.) et Mancini (G.). — *Acta neurol., Naples*, 1953, **8**, 911.

146 — Risetti (U.) et Mancini (G.). — *Acta neurol. Naples*, 1954, **9**, 391.

147 — Robin (Y.) et Thoai (N.V.). — *C.R. Acad. Sci.*, 1961, **252**, 1224.

148 — Roche (J.) et Robin (Y.). — *Ann. Nutr. et Aliment.*, 1962, **16**, A-22.

149 — Roche (J.), Thoai (N.V.), Robin (Y.) et Pradel (L.A.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1956, **150**, 1684.

150 — Roman (W.). — *Biochem. Z.*, 1930, **219**, 218.

151 — Rosenheim (M.C.). — *J. Physiol.*, 1917, **51**, Vi. Vii.

152 — Rosenheim (O.). — *Biochem. J.*, 1924, **18**, 1253.

153 — Rosenthal (S.M.) et Dubin (D.T.). — *Fed. Proc.*, 1960, **19**, 1.

154 — Rosenthal (S.M.) et Dubin (D.T.). — *J. Bact.*, 1962, **84**, 859.

155 — Rosenthal (S.M.), Fischer (E.R.) et Stohlman (F.). — *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, 1952, **80**, 432.

156 — Rosenthal (S.M.) et Tabor (C.W.). — *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1956, **116**, 131.

157 — Roulet (F.) et Zeller (E.A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1945, **28**, 1326.

158 — Rozansky (R.), Bachrach (U.) et Grossowicz (N.). — *J. gen. Microbiol.*, 1954, **10**, 11.

159 — Rozansky (R.), Razin (S.) et Grossowicz (N.). — *Bull. Research Council Israël*, 1954, **4**, 306.

160 — Sadtler Standard Spectra. — Sadtler Research Labs, Philadelphia midjet edition, 1959.

161 — Sakamoto (Y.), Ogawa (Y.) et Hayashi (K.). — *J. Biochem. Tokyo*, 1963, **54**, 292.

162 — Sanger (F.). — *Biochem. J.*, 1945, 39, 507.

163 — Sarkar (N.K.), Clarke (D.D.) et Waelsch (H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **25**, 451.

164 — Sax (S.M.), Harbison (P.L.), Sax (M.) et Baughman (R.H.). — *J. biol. chem.*, 1963, **238**, 3817.

165 — Schonberg (A.), Moubasher (R.) et Mostafa (A.). — *J. Chem. Soc.*, 1948, p. 176.

166 — Schreiner (P.). — *Liebigs Ann.*, 1878, **194**, 68.

167 — Schreus (H.T.) et Stuttgen (G.). — *Z. ges. exptl. Med.*, 1950, **115**, 553.

168 — Schultz (H.P.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 2666.

169 — Sevag (M.G.) et Drabble (W.T.). — *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1962, **8**, 446.

170 — Shimizu (H.), Kakimoto (Y.) et Sano (I.). — *J. Pharmacol.*, 1960, **143**, 199.

171 — Siekevitz (P.). — Biological structure et function, Vol. 1, p. 239, Academic Press Inc. New York, 1961.

172 — Siekevitz (P.) et Palade (G.E.). — *J. Cell. Biol.*, 1962, **13**, 217.

173 — Silvermann (M.) et Evans (E.A. Jr.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **150**, 265.

174 — Silvermann (M.) et Evans (E.A. Jr.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **154**, 521.

175 — Smith (E.D.) et Radford (R.O.). — *Analyt. chem.*, 1961, **33**, 1160.

176 — Sneath (P.H.A.). — *Nature*, 1955, **175**, 818.

177 — Tabor (C.W.). — *Fed. Proc.*, 1960, **19**, 139.

178 — Tabor (C.W.). — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1960, **2**, 117.

179 — Tabor (C.W.) — *J. Bact.*, 1962, **83**, 1101.

180 — Tabor (C.W.). — Methods in Enzymology, Vol. 5, p. 756, Academic Press New York, 1962.

181 — Tabor (C.W.) et Rosenthal (S.M.). — *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 1956, **116**, 139.

182 — Tabor (C.W.) et Rosenthal (S.M.). — Methods in Enzymology, S.P. Colowicz et N.O. Kaplan édit., Vol. 6, p. 615, Academic Press New York, 1963.

183 — Tabor (C.W.), Tabor (H.) et Rosenthal (S.M.). — *J. Biol. chem.*, 1954, **208**, 645.

184 — Tabor (H.). — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1960, **3**, 382.

185 — Tabor (H.), Rosenthal (S.M.) et Tabor (C.W.). — *Fed. Proc.*, 1956, **15**, 367.

186 — Tabor (H.), Rosenthal (S.M.) et Tabor (C.W.). — *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 907.

187 — Tabor (H.) et Tabor (C.W.). — *Fed. Proc.*, 1960, **19**, 6.

188 — Tabor (H.) et Tabor (C.W.). — *Pharmacol. Rev.* (U.S.A.), 1964, **16**, n° 3, 245.

189 — Tabor (H.), Tabor (C.W.) et Rosenthal (S.M.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 1961. **30**, 579.

190 — Terent'ev (A.P.), Kost (A.N.) et Chursina (K.I.). — *Zur obshchei Khim.*, 1951, **21**, 268 et *J. gen. Chem. U.R.S.S.*, 1951, **21**, 291.

191 — Tissieres (A.) et Hopkins (J.W.). — *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 1961, **47**, 2015.

192 — Unemoto (T.), Ikeda (K.), Hayashi (M.) et Miyaki (K.). — *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*, 1963, **11**, 148.

193 — Van Rheenen (D.L.). — *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, 1963, **82**, 225.

194 — Vauquelin (L.N.). — *Ann. Chim.*, 1791, **9**, 64.

195 — Vermeulen (M.). — Thèse de Pharmacie, Marseille, 1953.

196 — Weaver (R.H.) et Herbst (E.J.). — *J. Biol. chem.*, 1958, **231**, 637.

197 — Werle (E.), Trantschold (I.) et Aures (D.). — *Hoppe-Sel. Z.*, 1961, **326**, 200.

198 — Wrede (F.). — *Hoppe-Sel. Z.*, 1924, **138**, 119.

199 — Wrede (F.), Fanselow (H.) et Strack (E.). — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1927, **163**, 219.

200 — Wright (G.G.). — *Proc. Soc. exp. Biol. N-Y.*, 1961, **108**, 740

201 — Yamada (H.) et Yasunobu (K.T.). — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 511.

202 — Yamagishi (M.). — *J. Pharm. Soc. Japan*, 1954, **74**, 27.

203 — Yamagishi (M.). — *J. Pharm. Soc. Japan*, 1954, **74**, 599.

204 — Yamagishi (M.). — *J. Pharm. Soc. Japan*, 1954, **74**, 1075.

205 — Yamamma (Y.) Fujii (S.) et Okamina (Y.). — *Japan J. Med. Progr.*, 1960, **47**, 355, NIH Trans. 11-20-63.

206 — Zeitler (E.). — *Med. Klin.*, 1961, **56**, 1388.

207 — Zillig (W.), Krone (W.) et Albers (M.). — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1959, **317**, 131.

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Protamines et Histones